

LA PROTEÍNA C-REACTIVA Y LA OSTEOCALCINA DESCARBOXILADA COMO MARCADORES DE ARTERIOSCLEROSIS PRECLÍNICA EN NIÑOS SANOS PREPUBERALES

Inés Osiniri Kippes

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/395718>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



TESIS DOCTORAL

La Proteína C-Reactiva y la Osteocalcina descarboxilada
como marcadores de arteriosclerosis preclínica
en niños sanos prepuberales

Inés Osiniri Kippes

2015



TESIS DOCTORAL

La Proteína C-Reactiva y la Osteocalcina descarboxilada
como marcadores de arteriosclerosis preclínica
en niños sanos prepuberales

Inés Osiniri Kippes

2015

Doctorat de Ciències experimentals i sostenibilitat
Dirigida por:

Dr. Abel López Bermejo
Investigador I3
Institut d'Investigació Biomèdica de Girona
Médico adjunto de Pediatría
Servicio de Pediatría
Hospital de Girona

Dra. Judit Bassols Casadevall
Investigadora Miguel Servet
Institut d'Investigació Biomèdica de Girona
Hospital de Girona

Agradecimientos

A lo largo de este tiempo que llevo realizando el trabajo de investigación, numerosas personas me han prestado de diferentes formas, su colaboración y ayuda, aprovecho este momento para expresarles mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar a mi marido y mis hijos, por todas las horas robadas, por su comprensión, por acompañarme en todos estos años, por compartir esta ilusión.

A mis directores de tesis, Abel y Judit, por sus sugerencias y asistencias, por introducirme en este mundo de la investigación a formar parte de este proyecto donde he aprendido un montón y me ha apasionado mucho.

A mis compañeras de IDIBGI: Anna, Pilar, Silvia y Gemma, gracias por formar parte de este equipo y por vuestra gran labor, sin sus aportaciones sería todo mucho más difícil.

A Raquel, la gran madre de los pequeños y de los grandes... Siempre estás disponible para lo que necesitemos! Gracias por tu apoyo incondicional.

A mis amigos y a mis compañeros del servicio de pediatría del hospital de Figueres.

A los niños y sus padres que han confiado en nosotros y quisieron participar en este estudio.

Tabla de abreviaciones

AVC	Accidente vascular cerebral
BGP	Proteína ácida γ -carboxiglutámica del hueso
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
CMLV	Células musculares lisas vasculares
CV	Coeficiente de variación
DM 2	Diabetes mellitus tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
ELISA/EIA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
FNT	Factor de necrosis tumoral
GGCX	Gamma-glutamil carboxilasa
GIM	Grosor íntima media
GIMc	Grosor íntima media carotídea
Gla-OC	Residuos carboxilados de la OC
Glu-OC	Residuos descarboxilados de la OC
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HOMA-IR	Índice de resistencia a la insulina
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IL-6	Interleucina 6
IL-1	Interleucina 1
IMC	Índice de masa corporal
MetS+	Descendientes de familias con síndrome metabólico
MetS-	Descendientes de familias sin síndrome metabólico
MGP	Proteína Gla de la matriz ósea
OC	Osteocalcina
OCc	Osteocalcina carboxilada
OCdc	Osteocalcina descaboxilada
OC total	Osteocalcina total
OMS	Organización Mundial de la salud
OPG	Osteoprotegerina
PAS	Presión arterial sistólica
PAD	Presión arterial diastólica
PCR	Proteína C reactiva

PCRus	Proteína C reactiva ultrasensible
POD	Peroxidasa
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa- β
RCV	Riesgo cardiovascular
RI	Resistencia a la insulina
SM	Síndrome metabólico
TG	Triglicéridos
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
Valor Z del IMC	IMC ajustado por sexo y por edad

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
TABLA DE ABREVIACIONES	III
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	V
RESUMEN	1
RESUM	3
SUMMARY	5
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 RIESGO CARDIOVASCULAR	9
1.1.1 Principales factores de riesgo cardiovascular	10
1.1.2 Pared vascular	10
1.1.2.1 Medición del grosor de íntima media carotídea por ultrasonografía.....	12
1.1.2.2 Valores normales del grosor íntima media carotídea	14
1.1.2.3 Aumento del grosor íntima media carotídea	15
1.1.2.4 Enfermedad arteriosclerótica y grosor de la pared vascular	17
1.2 OBESIDAD.....	17
1.2.1 Obesidad infantil	18
1.2.2 Obesidad y arteriosclerosis.....	19
1.3 EL SÍNDROME METABÓLICO	22
1.3.1 Síndrome metabólico en niños	23
1.3.2 Prevalencia	25
1.3.3 Implicaciones clínicas del síndrome metabólico.....	26
1.3.3.1 Síndrome metabólico y riesgo de enfermedad cardiovascular.....	26
1.3.3.2 Síndrome metabólico y arteriosclerosis.....	27
1.4 LA PROTEÍNA C REACTIVA	29
1.4.1 Síntesis.....	30
1.4.2 Función	31
1.4.3 Valores de referencia en sangre.....	32
1.4.4 Marcadores de la inflamación y el riesgo cardiovascular	32
1.4.4.1 Relación entre la proteína C reactiva y la arteriosclerosis.....	33
1.4.4.2 Marcadores de la inflamación y la adiposidad.....	34
1.4.4.3 Relación de la proteína C reactiva con el síndrome metabólico.....	36

1.5 LA OSTEOCALCINA	38
1.5.1 Síntesis.....	38
1.5.2 Función	39
1.5.3 Valores de referencia en sangre.....	41
1.5.4 Osteocalcina y enfermedad cardiovascular	42
1.5.4.1 Osteocalcina y arteriosclerosis.....	44
1.5.4.2 Relación entre la osteocalcina y la adiposidad	45
1.5.4.3 Osteocalcina y síndrome metabólico	46
2 HPÓTESIS.....	49
3 OBJETIVOS.....	53
4 MATERIAL Y MÉTODOS	57
4.1 DISEÑO	59
4.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS	59
4.3 SUJETOS DE ESTUDIO	59
4.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE LOS SUJETOS.....	60
4.4.1 Criterios de inclusión	60
4.4.2 Criterios de exclusión.....	61
4.5 VARIABLES	61
4.5.1 Variables clínicas	61
4.5.2 Variables analíticas	64
4.5.3 Variables específicas	66
4.5.3.1 Proteína C reactiva ultrasensible	66
4.5.3.2 Osteocalcina total.....	66
4.5.3.3 Osteocalcina descarboxilada.....	67
4.5.3.4 Osteocalcina carboxilada y porcentaje de osteocalcina descarboxilada	69
4.5.4 Antecedentes familiares de síndrome metabólico	69
4.6 RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS	70
5 RESULTADOS	71
5.1 PROTEÍNA C REACTIVA Y GROSOR DE ÍNTIMA MEDIA CAROTÍDEA.....	73
5.1.1 Descripción de las variables clínicas y analíticas de la población de estudio agrupadas según el grado de peso corporal	73
5.1.2 Asociación entre la proteína C reactiva y el grosor de la íntima media carotídea en la población general de niños sanos prepuberales	73

5.1.2.1 Asociación entre la proteína C reactiva y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales según el grado de peso corporal.....	77
5.2 OSTEOCALCINA Y GROSOR DE ÍNTIMA MEDIA CAROTÍDEA	80
5.2.1 Descripción de las variables clínicas y analíticas de la población de estudio agrupadas según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico.....	80
5.2.2 Asociación entre la osteocalcina y el grosor de la íntima media carotídea en la población general de niños sanos prepuberales	81
5.2.3 Asociación entre la osteocalcina y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico.....	83
6 DISCUSIÓN.....	87
6.1 LA PROTEÍNA C REACTIVA Y EL RIESGO CARDIOVASCULAR	89
6.1.1 Asociación entre la proteína C reactiva y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales.....	90
6.1.2 Asociación entre la proteína C reactiva y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales según el grado de peso corporal.....	93
6.2 LA OSTEOCALCINA Y EL RIESGO CARDIOVASCULAR	95
6.2.1 Asociación de la osteocalcina y el grosor de íntima media carotídea en niños sanos prepuberales.....	97
6.2.2 Asociación entre la osteocalcina y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico.....	98
6.3 DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS	101
7 CONCLUSIONES.....	105
8 BIBLIOGRAFÍA.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 Estructura de la pared arterial	11
Figura 2 Técnica de medición ecográfica del GIMc.....	13
Figura 3 Imagen ecográfica: Arteria carótida común normal	15
Figura 4 Imagen ecográfica: Arteria carótida común con placa ateromatosa	16
Figura 5 Criterios para el diagnóstico de SM en adultos y niños	24
Figura 6 Definición de la IDF del síndrome metabólico en niños y adolescentes.....	24
Figura 7 Concepto de los componentes del SM.....	29
Figura 8 Proteína C Reactiva.....	30
Figura 9 Fisiopatología de la disfunción del tejido adiposo en pacientes obesos	35
Figura 10 Participación de los adipocitos durante la respuesta inflamatoria.....	36
Figura 11 Esquema de las modificaciones postraduccionales de la OC.....	38
Figura 12 Función endócrina de la OC.....	40
Figura 13 Representación esquemática de la interrelación entre células óseas, sistema vascular, tejido adiposo y metabolismo energético	44
Figura 14 Áreas de distribución de los CAP incluidos en el estudio.....	60
Figura 15 Recomendaciones para la medición del GIMc. Consensos europeo y americano.....	63
Figura 16 Medición ecográfica de la grasa perirrenal.....	64
Figura 17 Correlación gráfica de la PCRus con el GIMc en niños sanos prepuberales.....	78
Figura 18 Correlación gráfica de la OC total, OCdc y porcentaje de OCdc con el GIMc.....	84
Figura 19 Modelo propuesto de asociación entre la proteína C reactiva (PCR) y el grosor de la íntima media carotídea (GIMC).....	92
Figura 20 Modelo propuesto de asociación entre la osteocalcina descarboxilada y el grosor de la íntima media carotídea en pacientes con antecedentes de SM.....	101
Figura 21 Modelo propuesto de asociación entre la PCR, la OCdc y el GIMC.....	103
Tabla 1 Variables clínicas y bioquímicas de los sujetos de estudio para la población total y en subgrupos de acuerdo con la mediana del valor Z del IMC	73
Tabla 2 Coeficientes de correlación de la PCR con las variables seleccionadas para la población total de niños sanos prepuberales.....	75
Tabla 3 Modelo lineal multivariado del GIMc como variable dependiente en niños sanos prepuberales.	76

Tabla 4 Modelo lineal multivariado de la PCRus como variable dependiente en niños sanos prepuberales.	76
Tabla 5 Coeficientes de correlación de la PCR con las variables seleccionadas en niños sanos prepuberales en subgrupos de acuerdo con el valor Z del IMC.....	77
Tabla 6 Modelo lineal multivariado del GIMc como variable dependiente en niños sanos prepuberales en subgrupos de acuerdo con el valor Z del IMC.....	78
Tabla 7 Modelo lineal multivariado de la PCRus como variable dependiente en niños sanos prepuberales en subgrupos de acuerdo con el valor Z del IMC.....	79
Tabla 8 Variables clínicas y bioquímicas de los sujetos de estudio para la población total y en subgrupos según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico	81
Tabla 9 Coeficientes de correlación del GIMc con las variables seleccionadas para la población total de niños sanos prepuberales.....	82
Tabla 10 Modelo lineal multivariante del GIMc como variable dependiente en niños sanos prepuberales.	82
Tabla 11 Coeficientes de correlación del GIMc con las variables seleccionadas en niños sanos prepuberales en subgrupos según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico	83
Tabla 12 Modelo lineal multivariante del GIMc como variable dependiente en niños sanos prepuberales en subgrupos según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico	84

Resumen

La evidencia científica sugiere que la enfermedad arteriosclerótica tiene su origen en edades tempranas de la vida y su progresión está determinada por la suma de factores de riesgo cardiovascular, como la obesidad o el síndrome metabólico (SM). El grosor de la íntima media carotídea (GIMc) es considerado la mejor herramienta diagnóstica para la valoración de la arteriosclerosis en etapas subclínicas.

La proteína C reactiva (PCR) es un marcador de inflamación de bajo grado que tiene un papel en el desarrollo de la arteriosclerosis pudiendo predecir las complicaciones cardiovasculares en el adulto. La osteocalcina (OC) es una nueva molécula implicada en la calcificación vascular. La forma descarboxilada (OCdc) ha sido descrita como un marcador de calcificación carotídea en sujetos hipertensos.

En este trabajo hemos estudiado la PCR y la OCdc, como marcadores de arteriosclerosis preclínica en niños sanos prepuberales. Se ha analizado si la PCR y la OCdc se relacionaban con el GIMc y si estas asociaciones podían estar moduladas por el grado de peso corporal y la presencia de antecedentes familiares de SM.

Para ello diseñamos un estudio clínico de tipo descriptivo, transversal, en una muestra de niños sanos prepuberales de 7 años de edad (n=203; 102 niñas y 101 niños), provenientes de la población general y reclutados en los centros de atención primaria de la provincia de Girona, en la comarca de l'Alt Empordà. A todos los niños se les realizó un examen clínico y antropométrico. Se obtuvo una muestra de sangre en ayunas para realizar una analítica general y se midieron los marcadores de estudio: PCR, OC total y OCdc. También se realizó un examen antropométrico y se midió el GIMc mediante ecografía de alta resolución. Finalmente, se realizó un cuestionario de antecedentes familiares a los padres para determinar la presencia de SM.

Los resultados derivados de este estudio muestran que las concentraciones séricas de PCR son mayores en niños con mayor grado de peso corporal y se asocian a un perfil metabólico y vascular desfavorable. Los niveles séricos de PCR presentan asociaciones positivas con el GIMc, independientemente del grado de peso corporal.

Por otra parte, los niños con antecedentes de SM presentan mayor porcentaje de OCdc comparado con los niños sin antecedentes de SM. El porcentaje de OCdc se asocia a un perfil vascular desfavorable y presenta asociaciones positivas con el GIMc en niños con antecedentes de SM.

Estos resultados aportan nuevas evidencias sobre el papel de la PCR y de la OCdc como marcadores de arteriosclerosis preclínica en niños sanos prepuberales.

Resum

L'evidència científica suggereix que la malaltia arterioscleròtica té el seu origen en edats precoces de la vida i la seva progressió està determinada per l'aparició de factors de risc cardiovascular, com l'obesitat o la síndrome metabòlica (SM). El gruix de l'íntima mitja carotídia (GIMc) és considerat la millor eina diagnòstica per a la valoració de l'arteriosclerosi en etapes subclíniques.

La proteïna C reactiva (PCR) és un marcador d'inflamació de baix grau que té un paper molt important en el desenvolupament de l'arteriosclerosi i és capaç de predir les complicacions cardiovasculars en l'adult. L'osteocalcina (OC) és una molècula implicada en la calcificació vascular. La forma descarboxilada (OCdc) s'ha descrit com un marcador de calcificació carotídia en pacients hipertensos.

En aquest treball hem estudiat la PCR i la OCdc com a marcadors d'arteriosclerosi preclínica en nens sans prepuberals. S'ha analitzat si la PCR i la OCdc es relacionaven amb el GIMc i si aquestes associacions podien estar modulades pel grau de pes corporal i la presència d'antecedents familiars de SM.

És per això que hem dissenyat un estudi clínic de tipus descriptiu, transversal, en una mostra de nens sans prepuberals de 7 anys d'edat ($n = 203$; 102 nenes i 101 nens) provinents de la població general i reclutats en els centres d'atenció primària de la província de Girona, a la comarca de l'Alt Empordà. A tots els nens se'ls va realitzar un examen clínic i antropomètric. Es va obtenir una mostra de sang en dejú per fer una anàlítica general i es van mesurar els marcadors d'estudi: PCR, OC total i OC descarboxilada. A més a més es va mesurar el GIMc mitjançant ecografia d'alta resolució. També es va realitzar un examen antropomètric i un qüestionari d'antecedents familiars als pares per determinar la presència de SM.

Els resultats derivats d'aquest estudi mostren que les concentracions sèriques de PCR estan elevades en nens amb major grau de pes corporal i s'associen a un perfil metabòlic i

vascular desfavorable. Els nivells sèrics de PCR presenten associacions positives amb el GIMc, independentment del grau de pes corporal.

D'altra banda, els nens amb antecedents de SM presenten major percentatge de OCdc comparat amb els nens sense antecedents de SM. El percentatge de OCdc s'associa a un perfil vascular desfavorable i presenta associacions positives amb el GIMc, en nens amb antecedents de SM.

Aquests resultats aporten noves evidències sobre el paper de la PCR i de la OCdc com a marcadors d'arteriosclerosi preclínica en nens sans prepuberals.

Summary

Scientific evidence suggests that atherosclerotic disease has its origin early in life and its progression is determined by the sum of cardiovascular risk factors such as obesity and metabolic syndrome (MS). The carotid intima media thickness (cIMT) is considered the best available tool to assess arteriosclerosis in subclinical phases.

C-reactive protein (CRP) is a low grade inflammatory marker which has a role in the development of arteriosclerosis and can predict cardiovascular complications in adulthood. Osteocalcin (OC) is a new molecule involved in vascular calcification. The undercarboxylated form (udOC) has been described as a marker of carotid calcification in hypertensive subjects.

In this work we have studied CRP and udOC as markers of preclinical arteriosclerosis in healthy prepubertal children. We have examined whether CRP and udOC are related to cIMT and whether these associations could be modulated by body weight and family history of metabolic syndrome.

We have designed a descriptive cross-sectional study in a sample of 7 year-old healthy prepubertal children (n=203; 102 girls and 101 boys) from the general population, who were enrolled in primary care centers in Girona, in the region of Alt Empordà. All children were subjected to a clinical and anthropometric exam. CRP, total OC and udOC were quantified in fasting serum samples. cIMT was assessed using high resolution ultrasound. Anthropometric examination and a family background questionnaire were also performed in parents to determine the presence of MS.

The results from this study show that CRP levels are higher in children with more body weight and are associated with a less favourable metabolic and vascular profile. Serum CRP levels show positive associations with cIMT which are independent from the degree of body weight.

Moreover, children with family history of MS have higher percentage of uDOC compared to children without family history of MS. The percentage of uDOC is associated with a less favourable vascular profile and shows positive associations with cIMT in children with family history of MS.

These results provide new evidence on the role of CRP and uDOC as markers of preclinical arteriosclerosis in healthy prepubertal children.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Riesgo cardiovascular

Es la probabilidad que tiene un individuo de sufrir una ECV (angina de pecho o infarto miocardio, AVC, vasculopatía periférica, etc.) en los próximos 10 años, basado en el número y en la magnitud de los factores de riesgo presentes. Al hablar de ECV, nos estamos refiriendo a cualquier enfermedad que afecte al sistema cardiovascular. Está relacionado principalmente al proceso de desarrollo de arteriosclerosis, en el cual las arterias de mediano y gran calibre aumentan su rigidez, con disminución de la distensibilidad del vaso, formación de placas de ateroma, respuesta de mediadores de la inflamación, lesión del endotelio y formación de trombos, si el proceso continúa lleva a la oclusión de la luz vascular. Cuando se trata de las arterias coronarias se produce el infarto agudo de miocardio, en el caso de las arterias que irrigan el cerebro, se produce el AVC y a nivel de las arterias periféricas la claudicación vascular ¹.

Aunque la arteriosclerosis se manifiesta clínicamente en la adultez media y avanzada tiene una fase asintomática durante mucho tiempo de su desarrollo. Este proceso puede comenzar en la infancia temprana ². En la mayoría de los niños, los cambios vasculares arterioscleróticos son leves y se pueden minimizar o prevenir con un estilo de vida saludable ³. Sin embargo, en algunos niños, el proceso se acelera debido a la presencia de factores de riesgo o enfermedades específicas ^{4,5}. La identificación de los niños que corren mayor riesgo de desarrollar arteriosclerosis, puede permitir la intervención temprana y con ello disminuir el proceso arteriosclerótico, es decir prevenir o retrasar los eventos cardiovasculares.

Según los datos estadísticos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Marzo de 2013, las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Se calcula que en el 2008 murieron por esta causa 17.3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo; 7.3 millones de esas muertes se debieron a la cardiopatía

coronaria, y 6.2 millones a los AVC ⁶. Se calcula que en 2030 morirán cerca de 23.6 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías y AVC, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte ^{6,7}.

1.1.1 Principales factores de riesgo cardiovascular

Los factores de riesgo de ECV más conocidos hasta la actualidad son la obesidad, hipertensión arterial, diabetes, hiperlipidemia, estrés, tabaquismo y sedentarismo. Se clasifican en factores de riesgos “modificables” y “no modificables”. Los primeros son los responsables del 80% de los casos de cardiopatía coronaria y enfermedad cerebrovascular ⁶, están relacionados con los hábitos de vida como la dieta no saludable, el sedentarismo y el consumo de tabaco. Los “no modificables” son los que no dependen de los cambios de conducta como edad, sexo, raza y carga genética. Además, los efectos de una dieta poco saludable y de la inactividad física pueden manifestarse como “factores de riesgo intermedio”: Hipertensión arterial, hiperglicemia e hiperlipidemia, sobrepeso y obesidad.

El primer estudio poblacional de gran escala para evaluar las causas de arteriosclerosis es el estudio de Framingham en 1948 ⁸. Los investigadores determinaron la existencia de algunos factores que predisponen al individuo a desarrollar arteriosclerosis, es por primera vez cuando se empezó a hablar de los factores de RCV.

A medida que va creciendo el conocimiento de la ECV va aumentando el número de factores de riesgo conocidos. Hay diferentes scores (Framingham ⁹, Regicor ¹⁰) que permiten calcular el RCV individual de cada paciente.

1.1.2 Pared vascular

Las arterias son conductos membranosos, elásticos, con ramificaciones divergentes encargados de distribuir por todo el organismo la sangre expulsada desde las cavidades ventriculares del corazón en cada sístole.

Por ser el sistema arterial el más frecuentemente atacado por la arteriosclerosis, vamos a referirnos fundamentalmente a las características del mismo.

Las paredes arteriales son gruesas y compactas lo que les permite resistir las altas presiones generadas dentro del sistema circulatorio. Están compuestas por cilindros concéntricos dispuestos uno dentro del otro, en los cuales existen componentes celulares y extracelulares ¹¹.

Son tres túnicas las que forman la estructura arterial y se denominan de la luz arterial hacia la periferia de la siguiente manera (Figura 1):

- 1.- Íntima arterial.
- 2.- Capa media o músculo-elástica.
- 3.- Capa externa o adventicia.

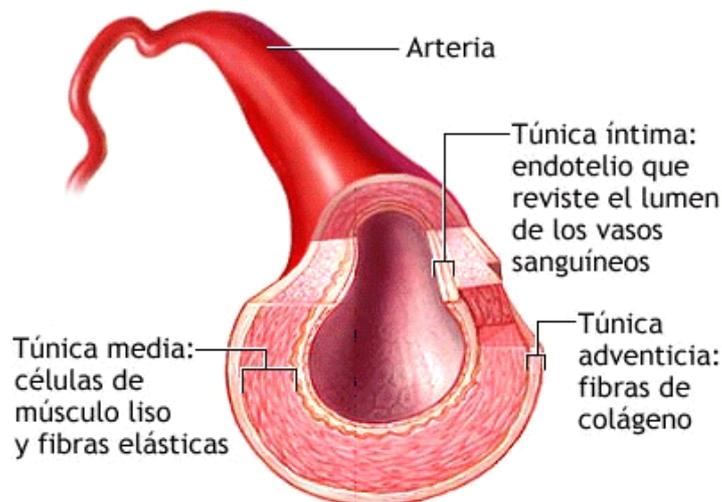


Figura 1. Estructura de la pared arterial (A.D.A.M. Suite of Healthcare Products).

1. Túnica Interna o íntima: Está constituida por el endotelio. La íntima está presente en todos los vasos (arterias o venas). El endotelio se encuentra en contacto con el torrente circulatorio. Esta situación topográfica del endotelio le da la característica de interfase biológica muy importante en la homeostasis vascular y en las relaciones flujo sanguíneo-pared arterial ¹².

2. Túnica media: Está compuesta por fibras musculares lisas dispuestas de forma concéntrica, fibras elásticas y fibras de colágeno en proporción variable según el tipo de arteria. Es una capa de aspecto compacto y de grosor regular. Las células musculares lisas de la capa media son de extrema importancia en el desarrollo del proceso arteriosclerótico, pues son capaces de atrapar lípidos y de emigrar hacia el subendotelio, para contribuir así a la formación de la placa ateromatosa ¹³.

3. Túnica externa o adventicia: Está formada por tejido conjuntivo laxo, compuesto fundamentalmente por fibroblastos y colágeno. Esta capa sirve de soporte mecánico a la arteria cuando la capa media arterial está debilitada por el proceso arteriosclerótico ¹³.

1.1.2.1 Medición del grosor de íntima media carotídea por ultrasonografía

El GIMc se define como la distancia entre los bordes de las interfaces lumen-íntima y la interfaz media-adventicia de la pared posterior de la arteria carótida. Es decir, comprende la sumatoria de las tunicas íntima y media de la pared arterial, por lo que el incremento del grosor puede estar determinado no sólo por la sobrecarga lipídica de la íntima como manifestación de arteriosclerosis, sino por el engrosamiento de la media como mecanismo fisiopatológico de la involución de la elasticidad de la pared. Para su medición, la ultrasonografía es el método más usado, se ha establecido como marcador válido no invasivo para estudiar cambios en la morfología de la pared vascular y seguimiento de la enfermedad arteriosclerótica. Las arterias de mediano y gran calibre como las femorales y las carótidas son las de elección por su fácil accesibilidad ¹⁴.

En 1984, Pignoli en un estudio de la pared arterial comparó mediciones realizadas por ecografía en individuos vivos y ecografía e histología en cadáveres humanos, confirmó que existía una correlación significativa entre las mediciones histopatológicas del grosor de la pared arterial y las mediciones realizadas con ecografía en modo B ¹⁵. En 1986, el mismo autor y sus colaboradores validaron la técnica de medición del GIMc mediante ecografía modo B ¹⁶.

Desde entonces, la ecografía carotídea se reconoce como una técnica con potenciales aplicaciones en el estudio de la enfermedad arteriosclerótica.

Debido a que existían diversos enfoques para la medición del GIMc llevando a resultados divergentes y a la necesidad de criterios para distinguir la formación de placas arterioscleróticas del aumento del GIMc, en el año 2006 Touboul y col. publicaron un consenso que estandariza las mediciones del GIMc y los criterios que definen la placa arteriosclerótica desde el punto de vista ecográfico ¹⁷.

La ecografía en modo B muestra en el plano longitudinal de la arteria sobre la pared posterior, un patrón de doble líneas paralelas entre sí determinadas por los cambios de impedancia acústica y que se correlacionan con los dos límites anatómicos: la interfase entre la luz arterial y la íntima y la interfase media-adventicia ^{18,19}.

La Figura 2 muestra la técnica de medición del GIMc ¹⁷ y la imagen ecográfica donde se visualizan las interfases de las capas íntima y media, ambas constituyen el denominado grosor íntima-medial (GIM).

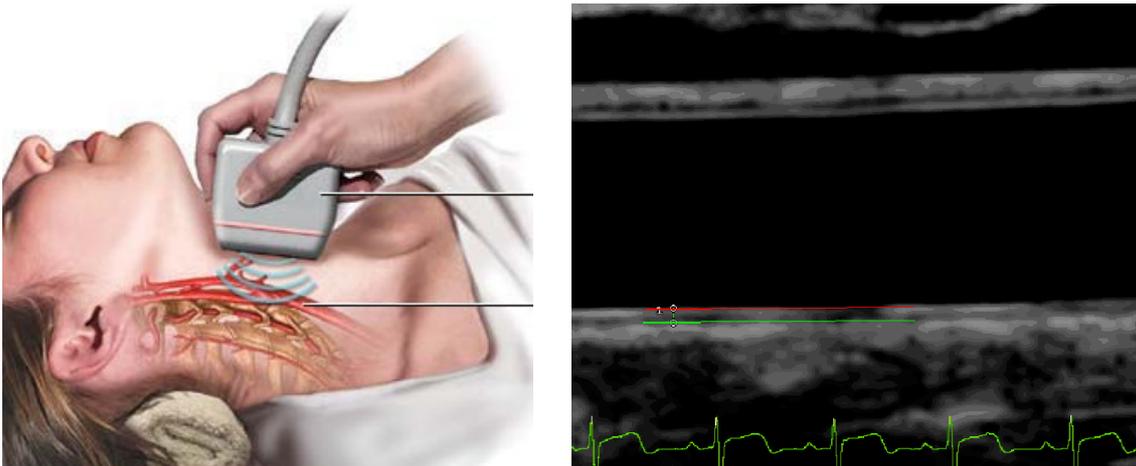


Figura 2. Técnica de medición ecográfica del GIMc. Figura de la izquierda: Esquema del sitio anatómico de medición en la región carotídea antes del bulbo (Imagen de ADAM Inc obtenida de Internet). Figura de la derecha: Imagen ecográfica con medición del GIMc. Se visualiza la arteria carótida común en el plano longitudinal. Sobre la pared posterior en el sitio de medición, se indica con la línea roja la interfaz lumen-intimal y la línea verde marca la interfase medio-adventicia ¹⁷.

1.1.2.2 Valores normales del grosor íntima media carotídea

En la población adulta, los valores de normalidad del GIMc están influenciados por la edad y el sexo. El punto de corte para caracterizar el valor normal del GIMc suele ser arbitrario y en general equivale al percentil 75. En adultos, el GIMc es menor en las mujeres que en los hombres. En el “Muscatine Study” el valor promedio del GIM combinado (carótida y femoral) fue de 0.79 ± 0.12 mm para hombres y 0.72 ± 0.10 mm para mujeres en edad adulta ²⁰.

El rango de valores normales del GIMc en adultos, tanto del GIM de la carótida común como del GIM de todos los segmentos carotídeos (carótida común, bulbo carotídeo y carótida interna) oscila entre 0.4 y 1.0 mm, con una progresión anual de 0.01 a 0.02 mm ²¹⁻²³.

De Groot y col. (2004), en un estudio realizado sobre 118 sujetos de 11 a 76 años, observaron que el GIMc de todos los segmentos carotídeos aumentaron con la edad desde 0.53 ± 0.03 mm a los 11 años hasta 0.77 ± 0.12 mm a los 76 años y además estimaron un incremento de 0.004 mm/año que se ve acelerado a 0.009 mm/año en individuos con hipercolesterolemia familiar ²⁴.

En el año 2005 Jourdan ²⁵ y col., estudiaron el GIMc en una población de 247 niños y adolescentes sanos de 10 a 20 años. Proporcionaron unos valores normales de referencia teniendo en cuenta la edad, el sexo, el IMC y la talla. No observaron diferencias del valor del GIMc con el sexo en los diferentes grupos de edad, en cambio el GIMc aumentó con la talla, el IMC y la edad desde 0.38 ± 0.04 mm en el grupo de 10 a 13.9 años hasta 0.39 ± 0.03 mm en el grupo de 17 a 20 años ²⁵. Resultados similares en relación al sexo informaron Sass y col. (1998), en un estudio sobre 369 sujetos de 10 a 54 años de edad, concluyeron que el GIMc no se ve afectado por el sexo ni por la edad hasta los 18 años, a partir de entonces aumentó de forma pronunciada en los hombres y se mantuvo más alto que en las mujeres ²⁶.

1.1.2.3 Aumento del grosor íntima media carotídea

Los incrementos en el GIMc pueden estar dados por engrosamiento de la capa íntima y/o de la capa media. Como existen limitaciones técnicas que impiden medir con precisión el grosor de cada una de estas capas por separado, la medición se realiza en el complejo íntima-media. Además, es sabido que las variaciones del GIMc pueden formar parte de una respuesta adaptativa ante cambios en el flujo sanguíneo, la tensión parietal y/o en el diámetro arterial ^{27,28}.

La medición del GIMc se debe realizar en una región libre de placa de arteriosclerosis, donde se visualiza el patrón de la doble línea en la pared posterior de la arteria, sobre un segmento arterial de 1 cm de longitud de la arteria carótida común, o a nivel del bulbo o en el origen de la arteria carótida interna ¹⁷ (Figura 3).

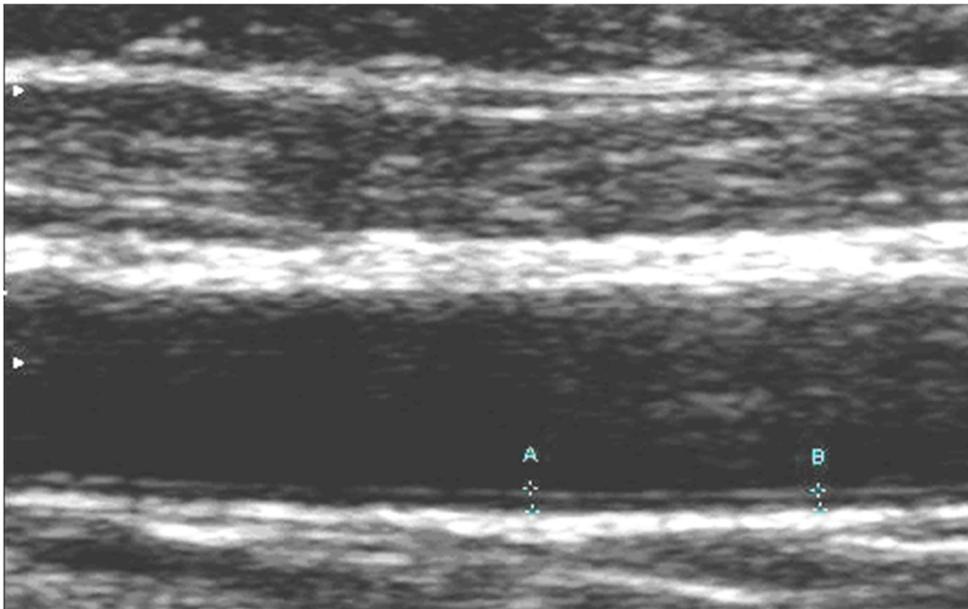


Figura 3. Imagen ecográfica: corte longitudinal de la arteria carótida común a 2 cm del bulbo, sin placa ateromatosa. Las cruces (A, B) marcan los puntos de medición del GIMc. (Imagen realizada por la autora)

La placa de ateroma es un engrosamiento focal que se extiende hacia el lumen arterial al menos 0.5 mm o aumento del GIM de más del 50% respecto a las paredes vecinas, o bien un

GIM mayor de 1.5 mm, medida desde la interface íntima-lumen a la interface media-adventicia ¹⁷ (Figura 4).

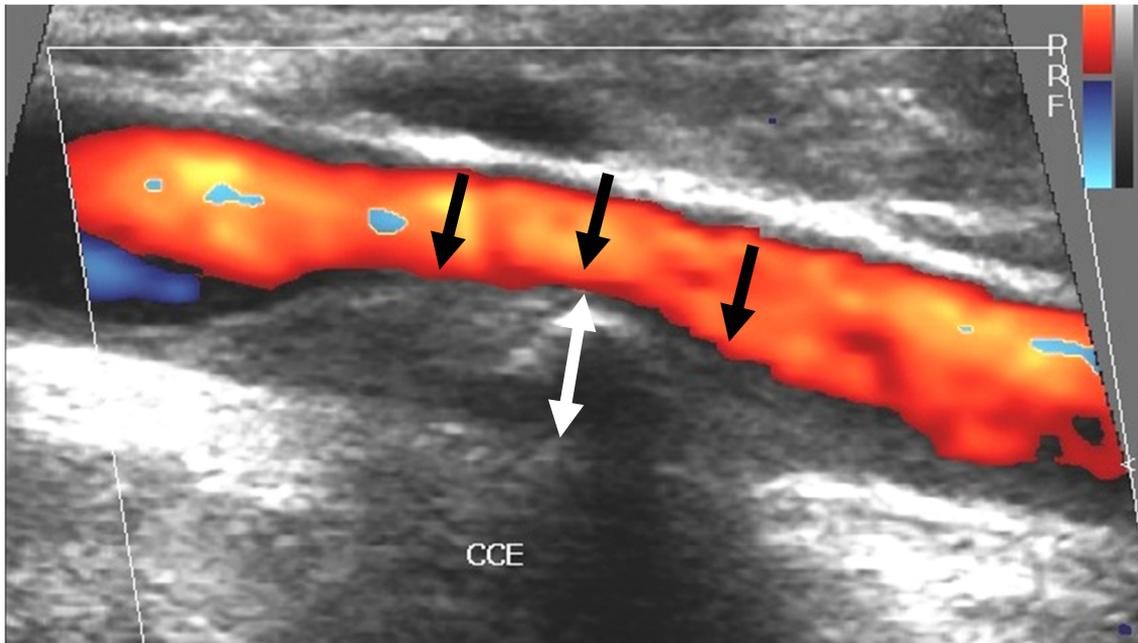


Figura 4. Imagen ecográfica con Doppler color: Corte longitudinal de la arteria carótida común izquierda. Se visualiza una placa aterosclerótica que se extiende hacia el lumen y obstruye parcialmente el flujo sanguíneo (flechas negras). La flecha blanca indica el grosor del GIMc. (Imagen obtenida de www.ecosdiagnosticos.blogspot.com)

El aumento del GIMc se ha asociado a la presencia de factores de RCV tradicionales, a la prevalencia e incidencia de infarto de miocardio, AVC, muerte por enfermedad coronaria, o a la combinación de estos eventos, a la gravedad de la arteriosclerosis en los diferentes territorios y a la presencia de daño en órgano blanco (por ejemplo, lesiones de la sustancia blanca en el sistema nervioso central, cardiopatías asociadas como hipertrofia ventricular) ²⁹⁻³⁵.

Asimismo, la presencia de factores de RCV emergentes (por ejemplo, aumento del fibrinógeno plasmático, lipoproteína A, homocisteína, ciertos polimorfismos genéticos y factores psicosociales como la precariedad), también se han asociado a cambios en el GIMc ³⁶.

Es importante señalar que la capacidad del GIMc para predecir el RCV es independiente de la presencia de otros factores de riesgo, la relación entre el incremento del

GIMc y el aumento de eventos cardiovasculares se estableció para un amplio rango de edades, alcanzándose el máximo valor de asociación entre los 42 y los 74 años ²⁹.

1.1.2.4 Enfermedad arteriosclerótica y grosor de la pared vascular

La enfermedad arteriosclerótica se produce por el engrosamiento y endurecimiento de la pared arterial, este efecto hace que con el tiempo las arterias se estrechen, llegando a la oclusión arterial. Se caracteriza por el depósito de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre con engrosamiento focal de la pared denominado placa de ateroma. Estas alteraciones de la pared vascular son precedidas durante décadas del silencio clínico.

Los primeros cambios morfológicos de las paredes arteriales pueden ser visualizados por ecografía en modo B. La ecografía de alta resolución es una técnica no invasiva, segura y reproducible, por lo que es uno de los mejores métodos para la detección de estadios tempranos de enfermedad arteriosclerótica ya que es rápidamente aplicable, fácilmente disponible y muestra la estructura de la pared con mejor resolución que cualquier otra técnica similar (imágenes por resonancia magnética). Los estudios experimentales en primates no humanos ³⁷ y en sujetos humanos ^{38,39} indican que las lesiones arterioscleróticas pueden progresar sin una reducción del tamaño luminal, debido a la dilatación de la pared arterial. Por lo tanto, en presencia de enfermedad aterosclerótica, para una correcta estimación del tamaño de las lesiones se requiere la medición simultánea del grosor de la pared arterial y del tamaño luminal residual ⁴⁰. Sin embargo no hay experiencia suficiente sobre valores de normalidad del GIMc y su asociación con marcadores de riesgo cardiovascular en niños sanos prepuberales.

1.2 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial que suele iniciarse en la infancia y en la adolescencia. Se define como una sobrecarga adipocitaria o exceso de

grasa manifestado por un aumento de peso y volumen corporal ⁴¹. Habitualmente se utiliza el IMC por encima de 30 como indicador de obesidad en el adulto. Se calcula a partir del peso en Kg dividido por la altura en metros al cuadrado (Kg/m^2).

Se cree que la principal causa de obesidad de un individuo es la interacción entre la genética y los hábitos de salud, estos últimos son los factores más importantes ya que establecen el desequilibrio entre la ingesta (sobrealimentación) y el gasto energético (sedentarismo) ^{41,42}. Dicho de otra manera, aunque un individuo presente un genotipo adiposo, son las condiciones ambientales las que desencadenarán el fenotipo ⁴².

Actualmente, existen tratamientos dirigidos a tratar la obesidad y sus síntomas, pero no modifican la carga genética del individuo y por lo tanto se mantiene la frecuencia de los alelos causantes de la obesidad en la población. Por este motivo, la investigación actual se centra en detectar precozmente desde la infancia el RCV en el estadio subclínico, con el fin de prevenir la obesidad y sus asociaciones mórbidas ⁴³.

1.2.1 Obesidad infantil

La OMS afirma que la obesidad infantil es uno de los problemas de salud pública más importantes del siglo XXI ⁴⁴. Afecta a todas las capas sociales y económicas y se está extendiendo a las zonas urbanas de los países en desarrollo ⁴⁵. En España, según los datos del 2011 del estudio ALADINO realizado en niños entre 6 y 9 años de edad, la prevalencia de obesidad fue del 18.3% para el grupo total, cuando el análisis se realizó por grupo de edad la prevalencia aumentó a partir de los 7 años tanto en niños como en niñas ⁴⁶.

Para definir la obesidad en pediatría se utiliza el IMC ajustado por sexo y edad, es el valor Z del IMC ^{47,48}.

La evolución del IMC en los niños refleja las etapas de desarrollo del tejido adiposo infantil: al nacer hay un incremento rápido del tejido adiposo durante el primer año de vida, seguido por una disminución hasta los 3-4 años y de nuevo un incremento conocido como

rebote adiposo que tiene lugar a partir de los 5-6 años. La edad de inicio de este rebote adiposo parece ser el mejor predictor de obesidad en la edad adulta. Cuando más precoz sea el rebote, mayor es el riesgo de padecer obesidad o alguna de sus comorbilidades asociadas en la edad adulta ⁴¹. Además hay estudios longitudinales que sugieren que la obesidad infantil después de los 3 años de vida, se asocia a largo plazo con un mayor riesgo de obesidad en la edad adulta y con un aumento de enfermedades asociadas ⁴⁹. La valoración cuantitativa de la grasa corporal en el niño y en el adolescente se lleva a cabo mediante el empleo de estrategias diferentes: por estimación como es la valoración de parámetros antropométricos: peso, talla, IMC e índice cintura-cadera, impedanciometría bioeléctrica o por medición directa utilizando técnicas específicas como la densitometría.

1.2.2 Obesidad y arteriosclerosis

Si tenemos presente que los factores que aumentan el riesgo de arteriosclerosis son aquellas condiciones que preceden a la enfermedad y que mantienen con ella una significativa correlación estadística y con gran poder predictivo; entonces podemos afirmar que el aumento de peso corporal a expensas de la masa grasa, observado por la inspección al individuo y corroborado entre otros parámetros por el IMC, nos lleva al diagnóstico de obesidad y por lo tanto es un factor de riesgo de arteriosclerosis ⁵⁰. La obesidad y la arteriosclerosis son procesos multifactoriales con algunos puntos en común, pues muchos de los elementos fisiopatológicos que tienen lugar en el obeso son asimismo factores de riesgo para la arteriosclerosis.

Por otra parte, la distribución de la grasa corporal es importante, la obesidad de tipo androide, visceral o abdominal tiene un tejido adiposo cuyas células son más secretoras que almacenadoras de grasa, por lo que las personas que sufren este tipo de obesidad tienen mayor riesgo de arteriosclerosis ^{50,51}. Es sabido que la arteriosclerosis es más frecuente en las personas obesas debido a las alteraciones del metabolismo de los lípidos que padecen, así como el incremento de los procesos oxidativos que también presentan. Además, los individuos

obesos son más propensos a sufrir hipertensión arterial, resistencia a la insulina (RI) e hiperinsulinemia, diabetes mellitus y SM entre otros, hecho que acelera en consecuencia el proceso aterogénico ⁵².

En la niñez, la arteriosclerosis es leve y evoluciona lentamente. En los niños obesos la arteriosclerosis empeora rápidamente causando un aumento del riesgo de ECV y menos frecuentemente puede provocar un AVC en la edad adulta temprana ⁵³.

En 1998 Berenson y col., estudiaron la presencia de arteriosclerosis en la aorta y en las coronarias en 204 autopsias de personas de 2 a 39 años de edad, lo relacionaron con los factores de RCV (obesidad, hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo e intolerancia a los hidratos de carbono) ². Estos autores confirmaron que todos los individuos en los diversos grupos de edad estudiados tenían lesiones arterioscleróticas iniciales denominadas estrías grasas tanto en la aorta como en las arterias coronarias. La prevalencia de estrías grasas en las arterias coronarias aumentó con la edad, de un 50% entre 2 y 15 años hasta el 85% entre los 21 y 39 años de edad. Concluyeron que a medida que el número de factores de RCV aumentaba, también lo hacía la gravedad de la arteriosclerosis preclínica a nivel coronario y aórtico en los individuos jóvenes ².

Reinehr y col. (2006) estudiaron el GIMc con ecografía de alta resolución en niños obesos y sus asociaciones con marcadores inflamatorios, tolerancia a la glucosa y presión arterial ⁵⁴. Sus estudios concluyeron que el GIMc estaba incrementado en niños obesos, es decir, que los cambios vasculares de la obesidad parecen ocurrir ya en la infancia temprana. Estos cambios estaban relacionados con los factores de RCV de la obesidad, especialmente la hipertensión, la inflamación crónica, y la alteración del metabolismo de la glucosa ⁵⁴. Posteriormente, el mismo autor, en un trabajo publicado en el 2011 reafirmó que los primeros cambios vasculares se observaron en los niños obesos y que a su vez el GIMc se asoció a hipertensión arterial, dislipemia o alteración del metabolismo de la glucosa. Además agregó

que estos cambios vasculares son reversibles con el tratamiento eficaz de los factores de RCV⁵⁵.

Fang y col. (2010) investigaron los factores de riesgo que influyen en el GIMc en 86 niños obesos, de los cuales 23 también tenían SM y los compararon con 22 niños sanos del grupo control⁵⁶. Observaron que los niños obesos y obesos con SM tenían aumentado el GIMc en comparación con el grupo control, pero no había diferencia significativa del GIMc entre el grupo de niños obesos y obesos con SM. El GIMc se correlacionó con el peso corporal, IMC, circunferencia de cintura, PAS, PAD, la RI y lípidos en sangre. Concluyeron que la obesidad especialmente abdominal, los niveles altos de triglicéridos en sangre y la resistencia a la insulina pueden ser los principales predictores de riesgo de aumento del GIMc⁵⁶.

En los últimos años ha habido un gran interés en determinar cuál es el marcador más precoz para detectar los primeros cambios de la enfermedad arteriosclerótica. La mayoría de los autores han demostrado de forma constante una fuerte asociación entre el GIM arterial y la obesidad, es decir la valoración del GIM vascular es un indicador temprano del inicio de la arteriosclerosis^{57,58}. En cambio, la presencia de otros factores de RCV como la hipertensión arterial, dislipemia, y alteraciones del metabolismo de la glucosa se han asociado de manera independiente al aumento del GIMc^{54,55,56}.

Por último, Freedman y col. (2008), en el Bogalusa Heart Study, han demostrado que la obesidad infantil es predictiva de los valores del GIMc del adulto⁵⁹. A pesar de ello, actualmente falta experiencia suficientemente documentada para conocer los valores de normalidad del GIMc en niños prepuberales no obesos y conocer su posible asociación con otros marcadores de arteriosclerosis en edades muy tempranas.

1.3 El síndrome metabólico

El SM era conocido hace más de 80 años, pero fue descrito por primera vez por Raeven en 1988 bajo el nombre de Síndrome X, que comprendía RI, hiperglucemia, hipertensión, niveles bajos de colesterol HDL y aumento de VLDL-triglicéridos; pero omitió la obesidad, considerada por algunos como componente esencial del síndrome, especialmente la obesidad de tipo visceral ⁶⁰. Es conocido por varios nombres como síndrome plurimetabólico, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome de Raeven, pero la OMS lo definió como SM. Es una entidad clínica definida por criterios específicos que aparece en personas con una predisposición endógena, la cual está determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales que aumentan el RCV y el riesgo de desarrollar DM 2. La causa exacta del SM aún se desconoce. Raeven propuso que la RI juega un papel causal, pero aún permanece incierto. El mayor interés del SM es que identifica pacientes con riesgo de DM 2 y ECV ⁶¹, ya que el aumento del riesgo de ECV se ve comúnmente en pacientes con SM ^{62,63}. Por otra parte, cada factor de RCV influye en la ECV de manera diferente en cada individuo. La RI y la obesidad abdominal son los ejes centrales del síndrome que aparece en personas metabólicamente susceptibles. Es decir, se caracteriza fundamentalmente por la presencia de RI e hiperinsulinismo compensador asociados a trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono, obesidad, hipertensión arterial, alteraciones lipídicas (hipertrigliceridemia, descenso del colesterol HDL, presencia de LDL-colesterol tipo B, aumento de ácidos grasos libres y lipemia postprandial), todas estas alteraciones de manera secuencial o simultánea pueden acumularse en el SM y potencialmente acelerar el desarrollo de ECV de origen arteriosclerótico ⁶⁴.

Clínicamente la RI, se define como la incompetencia de una determinada concentración de insulina para conseguir el control de la glucosa y aunque es la base fisiopatológica de la diabetes, no unificaría todos los aspectos etiológicos del SM. Es una

alteración celular compleja que implica fundamentalmente al tejido adiposo, al hígado y al músculo esquelético⁶⁵. Además de la susceptibilidad genética necesita de la presencia de otros factores ambientales como la obesidad central o abdominal, el sedentarismo y la dieta hipercalórica rica en grasas y carbohidratos. Sin embargo, esta relación no es exclusiva de personas obesas ya que se ha evidenciado la presencia de SM en individuos no obesos⁶⁶.

Varios autores definen el SM como una entidad poligénica y multifactorial^{67,68}. Se ha descrito la herencia de la RI entre familiares de primer grado con diabetes (45%) comparados con sujetos sin historia familiar de diabetes (20%)⁶⁷.

En el año 2002, el SM fue considerado primero como una condición de la edad adulta y estaba vinculado a la morbilidad de origen cardiovascular⁶⁹. Sin embargo, dos años más tarde se comienza a identificar cada vez más niños con criterios de SM⁷⁰.

1.3.1 Síndrome metabólico en niños

Al igual que en los adultos, el diagnóstico de SM en pediatría es clínico. Se han aplicado diferentes criterios para definir el SM en niños. Entre las definiciones internacionalmente aceptadas: la IDF (Federación Internacional de Diabetes)⁷¹, la OMS (Organización Mundial de la Salud)⁷² y APT III (Panel de Tratamiento del Programa de Educación Nacional sobre el Colesterol de Adultos)⁷³, difieren en que la IDF lo define a partir de los 6 años de edad y tiene como criterio diagnóstico esencial a la obesidad, mientras que la OMS tiene la RI como un requisito previo (Figura 5).

INTRODUCCIÓN

	Number of criteria	Obesity cutoff (twist circumference)		Triglyceride cutoff (mg/dl.)		High density lipoprotein cutoff (mg/dl.)		Hipertension cutoff (mmHg)		Glucosa (mg/dl./insulin cutoff)	
		Adult	Child	Adult	Child	Adult	Child	Adult	Child	Adult	Child
IDF	Obesity +2 others	> 94 cm male > 80 cm female	"Age-specific criteria" (sometimes stated > 75 to 95 th centile)	≥150	"Age-specific criteria"	< 40 in male or < 50 in females	"Age-specific criteria"	Systolic blood pressure ≥ 130 or diastolic blood pressure ≥ 85	"Age-specific criteria"	Fasting glucose ≥ 100 or existing type 2 diabetes	"Age-specific criteria"
WHO	Impaired glucose tolerance OR impaired fasting glucose OR insulin resistance +2 others	NA	>95 th or 97 th centile for waist circumference or BMI	NA	>95 th centile	NA	<5 th centile	NA	>95 th centile	NA	≥110
ATPIII	Any 3	>102cm male / >88cm female	"Age-specific criteria" (sometimes stated waist circumference 85-97 th centile, BMI 75 th -95 th centile)	≥150	"Age-specific criteria" (sometimes state >90 th or 95 th centile)	< 50	"Age-specific criteria" (sometimes state <5 th or 10 th centile)	Systolic blood pressure ≥ 130	"Age-specific criteria" (sometimes state >90 th or 95 th centile)	≥ 110	"Age-specific criteria"

Figura 5. Criterios para el diagnóstico de SM en adultos y niños. Definidos por la Federación Internacional de Diabetes (IDF) ⁷¹, Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁷² y Panel de Tratamiento del Programa de Educación Nacional sobre el Colesterol de Adultos (ATP III) ⁷³. NA, not applicable.

En el año 2007 Zimmet y col., elaboraron un informe de consenso que identifica a los niños con riesgo de desarrollar SM. Los criterios utilizados han sido adaptados para la edad y el peso del niño, a partir de los criterios diagnósticos de adultos ^{74F} (Figura 6).

Edad (años)	Perímetro cintura	TG	HDL	PA	Glucemia o DM2 conocida
6-9	≥ p90	No se debe diagnosticar SM, pero deben extremarse las MEV si AF de SM, DM2, dislipemia, ECV, HTA y/o obesidad			
10-15	≥ p90	≥ 150 mg/dl	≤ 40 mg/dl	PAS ≥ 130 o PAD ≥ 85 mmHg.	GB > 100 mg/dl
≥ 16	Aplicar los criterios de la IDF adultos: <ul style="list-style-type: none"> • Perímetro cintura ≥ 94 cm varones, ≥ 80 cm mujeres caucásicas. Dos de los cuatro datos siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • TG ≥ 150 mg/dl o recibe tratamiento • HDL ≤ 40 mg/dl en hombres, < 50 mg/dl en mujeres o recibe tratamiento • PAS ≥ 130 o PAD ≥ 85 mmHg o recibe tratamiento • GBA (≥ 110 mg/dl) o ATG o DM2 				

TG: triglicéridos; PA: presión arterial; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; GB: glucemia basal; GBA: glucemia basal alterada; ATG: alteración de la tolerancia a la glucosa; MEV: modificaciones estilo de vida; AF: antecedentes familiares; ECV: enfermedad cardiovascular; SM: síndrome metabólico; DM: diabetes mellitus; HTA: hipertensión arterial.

Nota: los niños de 10 a 15 años deben cumplir al menos tres de los cinco criterios anteriores.

Figura 6. Definición de síndrome metabólico en niños y adolescentes por la IDF ⁷⁴.

Por otra parte, el Grupo Europeo para el estudio de la RI junto con la OMS lo definen por la presencia de tres de los cinco componentes: obesidad central, aumento de la tensión arterial, aumento de triglicéridos, hiperglicemia en ayunas y disminución del colesterol HDL ⁷⁵.

La evidencia científica ha demostrado que las alteraciones típicas del SM pueden iniciarse en la infancia habiendo sido ya encontradas en niños obesos prepuberales ⁷⁶.

Vanhala y col. (1998), observaron que la mitad de los niños obesos llegan a ser adultos obesos con el consecuente aumento del riesgo hasta 3 veces más de padecer SM respecto a adultos obesos que no habían presentado sobrepeso en la infancia ⁷⁷. Sin embargo hay datos sólidos que demostraron la reversibilidad del síndrome en etapas precoces, los cambios del estilo de vida, la pérdida de peso y el ejercicio físico pueden ser beneficiosos ⁷⁸.

La presencia de factores de RCV se han demostrado en los hijos de las familias con SM, lo que puede causar en estos niños un aumento del RCV y de presentarse más precozmente ^{79,80}. Hemos referido antes que el SM tiene un componente hereditario, varios autores observaron que la presencia de factores de riesgo metabólico en familiares predice futuros eventos cardiovasculares en la descendencia ^{79,81,82}. Por lo tanto es muy importante identificar a las familias con SM porque supone la existencia de factores marcadores de RCV en sus hijos desde la infancia temprana.

1.3.2 Prevalencia

Estimar la prevalencia de SM en los niños no es sencillo, puesto que para definirlo se han aplicado múltiples criterios. En una revisión de 27 estudios, se han utilizado cuarenta definiciones diferentes ⁸³. Otra revisión realizada en el año 2009, aplicando 14 definiciones de SM para una población de niñas, observaron que la prevalencia del SM variaba entre el 0.4 % y el 24 % ⁸⁴. Además de los diferentes componentes medidos, como por ejemplo la RI frente a los niveles de glucosa en plasma en ayunas, los valores de umbral considerados anormales variaron con los puntos de corte de los percentiles de obesidad o del IMC.

Otros estudios observaron que cuando se trataba de niños y adolescentes obesos, la prevalencia se aproximaba al 50% ⁸⁵⁻⁸⁷.

La situación en España es un poco diferente, en un estudio realizado en niños y adolescentes entre 4 y 18 años con obesidad moderada, se ha observado una prevalencia de SM del 18% (utilizando los criterios de Cook y col. ⁸⁵) y de RI del 35% ⁸⁸.

Debido al aumento de la prevalencia de la obesidad en la infancia ⁸⁹ y a la relación entre la obesidad y el SM ⁷⁰, existe la posibilidad de que la prevalencia del SM en niños se incremente con implicaciones en el aumento de la morbimortalidad de causa cardiovascular.

1.3.3 Implicaciones clínicas del síndrome metabólico

El SM puede ser diagnosticado en la infancia según las diferentes clasificaciones existentes. Pero el hecho más importante que debemos considerar es si el diagnóstico del SM o de sus componentes en la infancia es un factor de riesgo potencial para el desarrollo de la ECV y diabetes en la vida adulta.

1.3.3.1 Síndrome metabólico y riesgo de enfermedad cardiovascular

Como hemos referido antes, el SM se define como un conjunto de criterios de riesgo metabólico que se asocian aumentando el riesgo de ECV y de diabetes. Además, el RCV derivado de las diferentes combinaciones de los componentes del SM no es uniforme, cada componente es un factor de riesgo independiente para las ECV y todos ellos interactúan sinérgicamente aumentando aún más el riesgo. Esto pone en relevancia la importancia de la identificación de individuos con SM en etapas precoces para prevenir o retrasar los eventos cardiovasculares.

La capacidad del SM en la infancia para predecir el riesgo de ECV en la vida adulta fue demostrada por Morrison y col. en el año 2007 ⁹⁰. En el estudio *The Princeton Lipid Research Clinics Follow-up Study* realizado en una población de 771 adultos (edad media de 38 años)

procedentes de una cohorte inicial de niños que habían participado en un estudio sobre el nivel de lípidos en sangre en la edad escolar (edad media de 12.9 años). En el estudio inicial la prevalencia del SM fue del 4%. El 68% de los niños que habían presentado SM en la edad pediátrica tuvieron SM en la edad adulta. La incidencia de ECV durante los años de intervención fue del 19.4% en los pacientes con SM en la edad pediátrica y del 1.5% en los niños sin SM. Además los niños con SM tenían un riesgo de 14.6 veces superior para presentar ECV en la vida adulta ⁹⁰. Más tarde, confirmó que para el desarrollo de SM en la edad adulta fueron predictores en la infancia: el diagnóstico de SM, el aumento del IMC y la presencia de diabetes en los padres; además cuando se consideró la raza blanca también fue predictora para la DM 2 en la vida adulta ⁹¹.

1.3.3.2 Síndrome metabólico y arteriosclerosis

Sabemos que la obesidad en la niñez aumenta el riesgo de ECV temprana y muerte precoz en la edad adulta ^{89,92} al contribuir a una mayor prevalencia de factores de RCV del adulto, tales como hipertensión, dislipemia y alteración del metabolismo de la glucosa ^{93,94}.

Se propone que la exposición persistente a factores bioquímicos e inflamatorios de RCV desde la edad temprana, afectan a la función del endotelio vascular, induciendo cambios en las arterias que contribuyen al desarrollo de arteriosclerosis prematura ^{82,95}. Por lo tanto podemos afirmar que junto con la obesidad, estos factores en su conjunto, constituyen el llamado SM y promueven el desarrollo de arteriosclerosis ⁹⁶.

Sabemos que el proceso arteriosclerótico comienza en la infancia y se mantiene silencioso durante un largo período de tiempo antes de las manifestaciones clínicas. En adultos, el GIMc se considera un importante marcador predictivo de la arteriosclerosis generalizada debido a su correlación con la llamada “enfermedad de la arteria coronaria” y puede predecir futuros eventos cardiovasculares ⁹⁷. Estas alteraciones vasculares se valoran con la medición del GIMc a través del ultrasonido de alta resolución, que ha demostrado ser

un excelente método no invasivo, seguro y capaz de detectar cambios estructurales precoces a nivel de las arterias carótidas ⁹⁸.

En una revisión presentada por Woo y col. (2004) señalaba que en los niños y adolescentes con factores de RCV marcados, como hipertensión arterial y dislipemia severa, o diabetes mellitus tipo 1 presentaban un aumento del GIMc ⁹⁹. La literatura científica ha demostrado que los precursores de ECV de origen aterosclerótico están presentes en la edad pediátrica. Así lo describieron también diversos estudios realizados con autopsias donde confirmaron que la extensión de la arteriosclerosis temprana en la aorta y en las arterias coronarias se asoció directamente con los niveles de lípidos en sangre, la presión arterial y la obesidad en la infancia y en la adolescencia ^{100,101}.

Por otra parte, un grupo de investigadores han estudiado con medidas no invasivas la morfología y la función vascular periférica en sustitución de métodos invasivos utilizados para valorar las arterias coronarias, mostraron asociaciones entre la arteriosclerosis subclínica y el riesgo cardiometabólico, factores ya presentes en la niñez ^{102,103}.

La obesidad, especialmente la obesidad abdominal y la RI están directamente relacionadas tanto clínica como epidemiológicamente con el desarrollo del SM y el RCV (Figura 7).

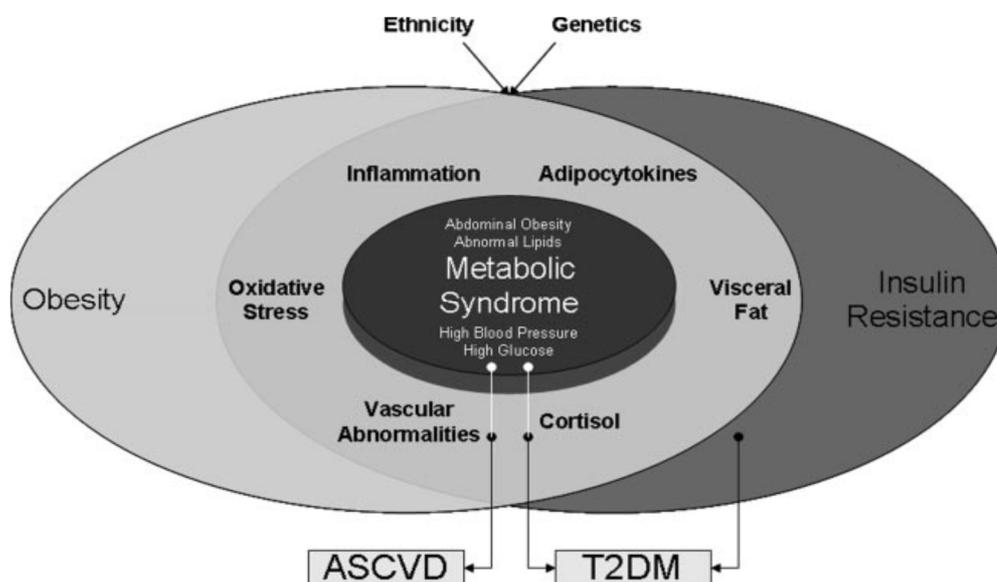


Figura 7. Se muestra el concepto de los componentes del SM. Surgen de las interacciones entre las alteraciones vasculares, el estrés oxidativo, la grasa visceral, la inflamación, las adipocitoquinas y el cortisol formando parte de un entorno más amplio de la obesidad y la RI, bajo la influencia de predisposiciones genéticas y étnicas que en última instancia resulta en la enfermedad. Una visión resumida del riesgo cardiometabólico debido a que la obesidad no solo requiere valorar a los marcadores tradicionales del SM, sino que también requiere un estudio metabólico completo, que incluye el conocimiento de los antecedentes familiares y hábitos de vida. (Steinberger 2009) ¹⁰⁴. ASCVD: enfermedad cardiovascular de origen arteriosclerótico. T2DM: diabetes mellitus tipo 2.

1.4 La proteína C reactiva

La PCR es una proteína inespecífica de fase aguda utilizada durante décadas como marcador de la inflamación. Dado que se considera que la inflamación juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria (véase abajo), los marcadores de la inflamación han sido estudiados extensamente en relación a la patología cardíaca ¹⁰⁵.

Numerosos estudios la han propuesto como un marcador de aterogénesis y como predictor para el desarrollo de eventos cardiovasculares adversos, en el futuro. La PCR resultó ser el único marcador de inflamación que predice de forma independiente el riesgo de un sufrir un infarto agudo de miocardio ¹⁰⁶.

Los niveles elevados de PCR pueden producir efectos directos sobre las células vasculares, incluyendo la inducción de citoquinas y factores prothrombóticos ¹⁰⁵. Juega un

importante papel en la patogénesis de la trombosis arterial no sólo de las arterias del corazón, sino cerebrales y pequeños vasos de la circulación sistémica ¹⁰⁷.

1.4.1 Síntesis

La PCR fue la primera proteína de fase aguda descrita y el nombre deriva de su capacidad para precipitar al polisacárido somático C del *Streptococcus pneumoniae*. Forma parte de la inmunidad innata y su síntesis es inducida como respuesta al daño tisular por infecciones, inflamación o neoplasias.

Es sintetizada por hepatocitos y células del endotelio vascular y su expresión está regulada por citoquinas, particularmente por la IL-6 y, en menor grado, la IL-1 y el TNF.

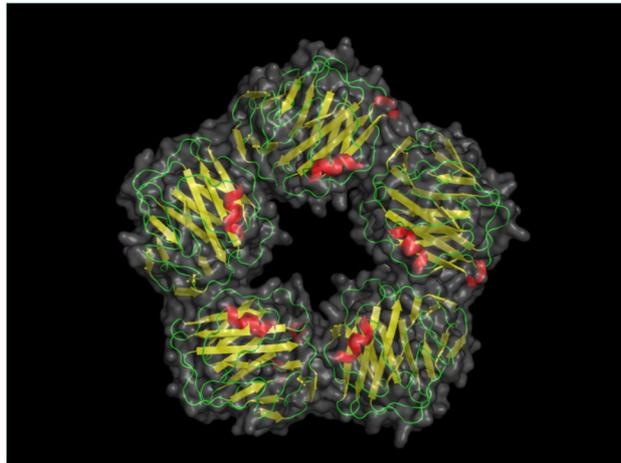


Figura 8. Proteína C Reactiva: Pentámero de 5 subunidades polipeptídicas de 23 kDa. (Gremolec 2009)¹⁰⁸

La PCR pertenece a una familia de proteínas pentaméricas dependientes de calcio llamadas pentraxinas. Aunque se produce como monómero, la molécula funcional está compuesta por cinco subunidades polipeptídicas de 23 kDa idénticas asociadas de manera covalente en una configuración anular con simetría cíclica (Figura 8). Las pentraxinas son proteínas que han subsistido a través de la evolución con proteínas homologas entre especies filogenéticamente distantes ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

1.4.2 Función

La PCR forma parte del sistema inmune innato. Su actividad es similar a la inmunoglobulina G (IgG), siendo capaz de activar el complemento, unirse a los receptores Fc y actuar como una opsonina para diversos patógenos. La interacción de la PCR con los receptores Fc conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias que mejoran la respuesta inflamatoria. A diferencia de la IgG, que reconoce específicamente epítopos antigénicos distintos, la PCR reconoce moléculas propias alteradas y extrañas. Por lo tanto, la PCR actúa como una molécula de vigilancia. Éste reconocimiento proporciona una defensa temprana y conduce a una señal proinflamatoria y a la activación del sistema inmune humoral adaptativo ¹¹⁰.

La inflamación es una respuesta compleja y necesaria del organismo ante estímulos biológicos, químicos o físicos. Los niveles de PCR se incrementan en 6 horas y llegan al máximo en 48 horas. Su vida media es constante y por lo tanto, su nivel está determinado principalmente por la tasa de producción y en consecuencia, por la gravedad de la causa. Dicho de otra manera, la respuesta inflamatoria sistémica es el conjunto de fenómenos clínicos y fisiológicos que resultan de la activación general del sistema inmune, con independencia de la causa que lo origine.

Es sabido que la inflamación crónica está presente en el origen de numerosas enfermedades como alergias, artritis, asma, arteriosclerosis, obesidad, diabetes, cáncer y facilita las condiciones de envejecimiento precoz de los órganos y vasos. El perfil específico de una determinada condición inflamatoria depende de la especie, los mecanismos, la gravedad, la cronicidad y la capacidad del sistema inmunitario para responder y adaptarse ¹⁰⁸.

La PCR también tiene efectos proaterogénicos directos en las CMLV. Investigaciones recientes sugieren que la PCR regula al alza los receptores de angiotensina tipo 1 en las células

del músculo liso vascular in vitro e in vivo y estimula la migración del músculo liso vascular, la proliferación, la formación de neointima y la producción de óxido nítrico ¹¹¹.

1.4.3 Valores de referencia en sangre

En los últimos tiempos con los métodos disponibles se detectaban valores con un límite aproximadamente de 5 mg/L, con la aparición de métodos de análisis ultrasensibles es posible determinar valores por debajo de 1 mg/L.

En casos de inflamación crónica los valores se sitúan por encima de 1mg/L pero por debajo de 10 mg/L que es considerado el valor de corte para descartar la presencia de un proceso inflamatorio agudo. Son estos valores de PCR ultrasensible (PCRus) entre 1 y 5 mg/L los que se relacionan con un aumento del RCV. En el Women's Health Study los investigadores estratificaron los valores predictivos de ECV según la escala de Framingham: PCR < 1.0 mg/L: bajo riesgo, entre 1-3 mg/L: riesgo intermedio y > de 3 mg/L: alto riesgo de ECV ¹¹².

1.4.4 Marcadores de la inflamación y el riesgo cardiovascular

Sabemos que la PCR es un reactante de fase aguda utilizado para el diagnóstico y vigilancia de las enfermedades inflamatorias. Varios estudios de base poblacional realizados en adultos, han demostrado una estrecha relación entre las concentraciones de PCR y el peso corporal ¹¹³⁻¹¹⁹. Por otra parte, la evidencia científica indica que la PCR puede tener un papel directo en los procesos ateroscleróticos ^{120,121}, así como el aumento de sus niveles en sangre es un potente predictor de desarrollo de complicaciones vasculares ^{115,122}.

La actividad inflamatoria de bajo grado a lo largo de la vida de la persona, puede causar daño vascular acumulativo, es el motivo por el cual se han diseñado estudios para investigar la relación entre la PCR y los factores de riesgo de ECV en pediatría ^{114,116}.

Dado que la ECV a menudo tiene su origen en la infancia y que varios factores de riesgo para ECV están presentes en la niñez y persisten en la edad adulta, la comprensión de la

distribución y las implicaciones de este tipo de factores de riesgo entre los niños es de gran interés. En este momento, el estudio de la PCR como factor de riesgo o como un marcador de ECV en los niños está en sus primeras etapas.

En un estudio publicado en el año 2010, Skinner y col., demostraron que la PCR aumenta en relación con la obesidad desde edades prepuberales ¹¹³. A pesar de ello, la asociación de mediadores de la inflamación con otros marcadores de RCV en niños sanos, no obesos y prepuberales está poco explorada en una edad tan precoz.

1.4.4.1 Relación entre la proteína C reactiva y la arteriosclerosis

La evidencia existente indica que la prevención de la aterosclerosis debería comenzar en los niños ¹²³. Las guías específicas para la prevención primaria en niños y adolescentes incluyen la evaluación del RCV con los factores convencionales tales como los lípidos séricos, la presión arterial, el tabaquismo y la obesidad, con el objetivo de identificar a los niños con alto riesgo de futura ECV ¹²⁴. La razón de centrarse en estos factores está basada en la evidencia observacional demostrando que el seguimiento de la niñez a la edad adulta ^{125,126} está relacionado con cambios arterioscleróticos en las personas jóvenes ^{2,101} y predecir la arteriosclerosis preclínica en adultos ¹²⁷⁻¹²⁹.

La fisiopatología de la arteriosclerosis ha sido recientemente demostrada al incluir la inflamación local como un promotor de la formación de la placa aterosclerótica ^{130,131}, así como un desestabilizador de la placa ^{132,133}. En favor de ello, varios estudios epidemiológicos prospectivos han demostrado que el aumento de la PCR es un predictor independiente de eventos cardiovasculares ¹³⁴. En apoyo al papel de la PCR en las primeras fases de la arteriosclerosis, en un estudio realizado en niños finlandeses han demostrado que niveles elevados de PCR están asociados con el aumento del GIMc y la disminución de la dilatación mediada por flujo de la arteria braquial ¹³⁵. Los resultados del estudio PDAY (Determinantes Patobiológicos de la Arteriosclerosis en Jóvenes) indican que el nivel de PCR en suero se asocia

de forma independiente con la arteriosclerosis avanzada en personas jóvenes ¹³⁶. Estas observaciones sugieren que la evaluación de la inflamación mediante la medición de la PCR sérica en la infancia podría agregar valor a las estimaciones de RCV a nivel pediátrico.

1.4.4.2 Marcadores de la inflamación y la adiposidad

De acuerdo con el concepto de la capacidad de expansión del tejido adiposo, las complicaciones vasculares de la obesidad se derivan de la incapacidad del tejido adiposo para almacenar la grasa acumulada, causando un estado de lipotoxicidad e inflamación de bajo grado ¹³⁷.

El tejido adiposo está formado por adipocitos y tejido conectivo altamente vascularizado e innervado, donde encontramos preadipocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y leucocitos. La composición variada del tejido adiposo hace que sea un importante mediador en el metabolismo y en la inflamación. Su localización es mayoritariamente en la región subcutánea (tejido adiposo subcutáneo) y alrededor de las vísceras (tejido adiposo visceral) ¹³⁸.

Las células específicas del tejido adiposo, los adipocitos, presentan la capacidad de acumular ácidos grasos en forma de triglicéridos cuando hay un exceso de energía y de liberarlos en caso de necesidad energética. Para llevar a cabo estas acciones, los adipocitos contienen todas las enzimas necesarias para la lipólisis (degradación de triglicéridos y liberación de ácidos grasos) y la lipogénesis (síntesis de triglicéridos a partir de ácidos grasos y glicerol fosfato en el citoplasma de las células). A medida que se acumula energía, el tejido adiposo se va expandiendo. Los adipocitos van incrementando en número y tamaño, lo cual puede dar paso a una disfunción adipocitaria. Además, los adipocitos secretan agentes proinflamatorios que promueven la inflamación sistémica. Cuando los adipocitos hipertrofiados con alto contenido lipídico mueren y liberan su contenido, se produce el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos. En pacientes obesos, este reclutamiento de

macrófagos resulta en una inflamación crónica de alto grado ¹³⁸ (Figura 9). El metabolismo lipídico en el tejido adiposo es dependiente del requerimiento energético del organismo y está regulado por nutrientes, señales hormonales y neuronales. Recientemente, se ha descubierto que el tejido adiposo no solo responde a estas hormonas sino que también las produce y las secreta haciendo que pase a considerarse como un órgano endocrino.

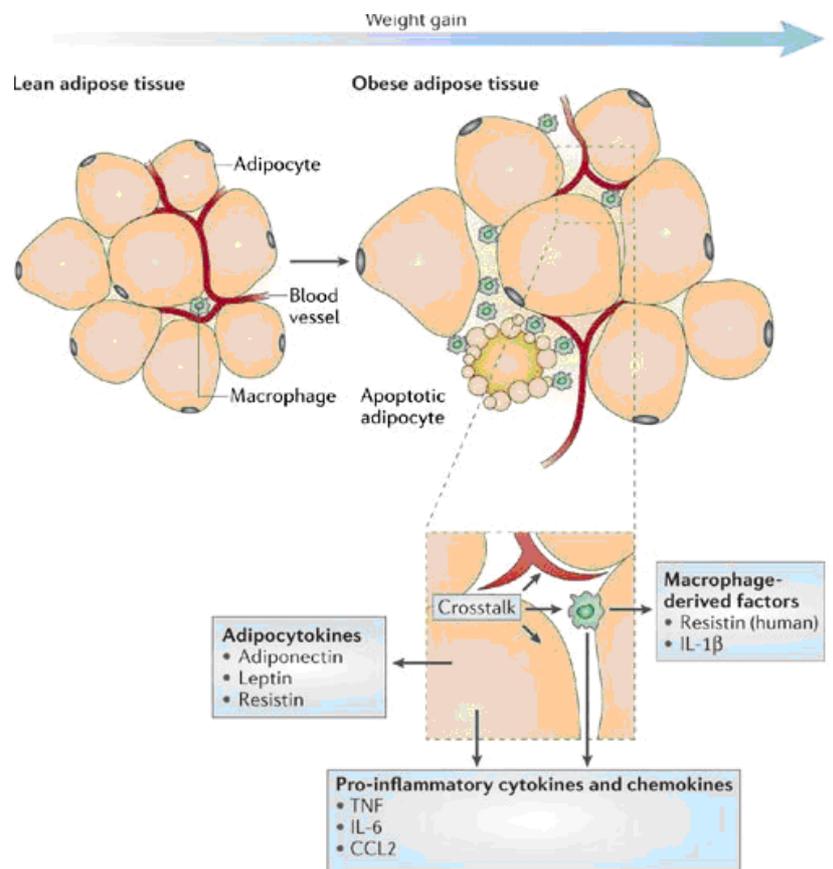


Figura 9. Fisiopatología de la disfunción del tejido adiposo en pacientes obesos ¹³⁸

Mediante estas señales moleculares, el adipocito participa en la regulación de múltiples funciones celulares y se comunica con células de otros tejidos localizados en órganos distantes, como el hipotálamo, el páncreas, el hígado, el músculo esquelético, los riñones, el endotelio y el sistema inmunitario. Una de las hormonas más importantes secretadas por el tejido adiposo es la leptina. A través de esta hormona el tejido adiposo se comunica con el

sistema nervioso central y participa en la regulación neuroendocrina de la homeostasis energética. Sin embargo, hay otras adipocinas importantes secretadas por el mismo tejido adiposo, que comprenden tanto *hormone-like proteins* como citoquinas inflamatorias ^{139,140} (figura 10). La vascularización e inervación de los tejidos adiposos dan una idea de la intensa actividad metabólica que presenta este tejido.

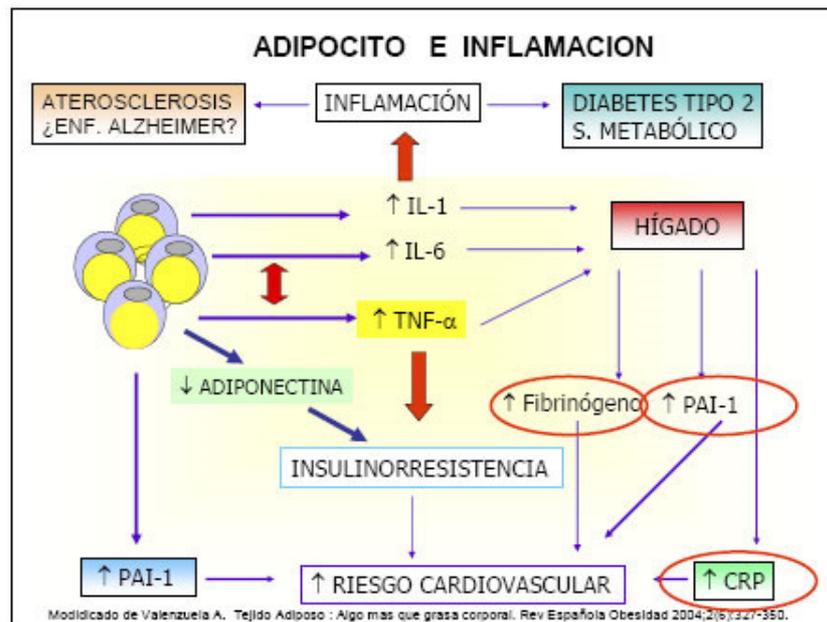


Figura 10. Participación de los adipocitos durante la respuesta inflamatoria (Modificado de Valenzuela 2004) ¹⁴⁰.

1.4.4.3 Relación de la proteína C reactiva con el síndrome metabólico

Actualmente existe un interés creciente para predecir la ECV. Los biomarcadores inflamatorios han sido extensamente estudiados y hasta el momento el más estandarizado desde el punto de vista inflamatorio es la PCRus. Numerosos estudios realizados en adultos han demostrado que los niveles de PCR en sangre son mayores en pacientes con SM. De hecho, se ha postulado la PCR como el mejor predictor de riesgo de ECV y diabetes de forma independiente de la condición de SM ¹⁴¹. Siguiendo la misma línea de estudio, Ridker y col. (2003), observaron que la población que tenía los niveles de PCR de 3 mg/L o menos mejoraba el pronóstico de cardiopatía coronaria y especialmente de diabetes en hombres con o sin

SM¹⁴². Por otra parte propuso que la PCR se añada como criterio clínico para el diagnóstico de SM ¹⁰⁶.

En el año 1997, en un estudio prospectivo sobre 28.263 mujeres adultas aparentemente sanas, postmenopáusicas, realizaron un seguimiento durante 3 años de eventos cardiovasculares asociados con los niveles de marcadores de la inflamación. Observaron que los niveles de PCR fueron significativamente mayores entre las mujeres que tenían todos los componentes del SM (obesidad, hipertrigliceridemia, niveles bajos de colesterol HDL, HTA, alteración del metabolismo de la glucosa, o las que tenían 3 o más criterios) que las mujeres que no tenían ningún componente de SM. Además, los niveles de PCR > 3mg/L al inicio del estudio proporcionaron una información pronóstica en todos los niveles de gravedad del SM. Este efecto aditivo era particularmente evidente entre aquellas tenían 3, 4, o 5 componentes del SM ¹⁴³. Varios investigadores afirmaban también, que los niveles de PCR en sangre se asociaban con los componentes individuales del SM en poblaciones mixtas ¹⁴⁴⁻¹⁴⁹.

Se ha confirmado el papel de la inflamación en el desarrollo de la diabetes y la enfermedad aterotrombótica ^{150,151} como un fuerte predictor del infarto agudo de miocardio ¹⁵² y de DM 2 ¹¹². Estas observaciones proporcionan una fuerte evidencia de que la RI y la arteriosclerosis comparten una base inflamatoria común ¹⁵³ y que también están asociadas con varios componentes del SM.

En niños la situación es diferente, no está suficientemente documentada la asociación de la inflamación con el SM. Akinici y col. (2007), estudiaron los factores de riesgo de arteriosclerosis en niños cuyos padres tenían SM y observaron que los niveles de PCR se correlacionaron positivamente con el IMC y con el número de componentes del SM. Además demostraron que el número de componentes del SM de los padres era un predictor significativo de los niveles de PCR de sus hijos ¹⁵⁴.

1.5 La osteocalcina

La osteocalcina, también conocida como proteína ósea Gla o BGP ^{155,156} es una de las proteínas no colágenas más abundantes de la matriz ósea.

1.5.1 Síntesis

Es sintetizada principalmente por los osteoblastos durante el proceso de remodelación ósea. Presenta un peso molecular aproximado de 5,8 kDa y consta de 49 aminoácidos. Se caracteriza por la presencia de tres residuos ácido gammacarboxiglutámicos (Gla) en las posiciones 17, 21 y 24 ¹⁵⁷ (Figura 11) responsables de su alta afinidad por la hidroxiapatita del hueso ¹⁵⁸. El gen de la OC en el ser humano se localiza en el cromosoma 1q25-q31 ¹⁵⁹.

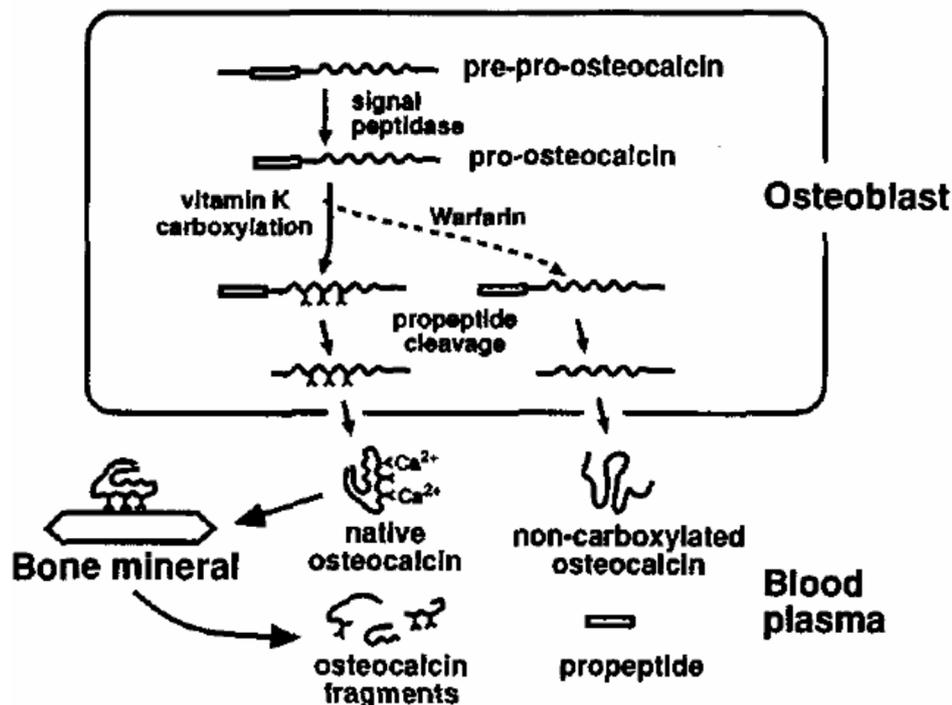


Figura 11. Esquema de las modificaciones postraduccionales de la OC ¹⁵⁷ (Adaptado de Robins, S. 1993).

La síntesis de OC depende tanto de la vitamina D como de la vitamina K. La vitamina D 1,25-dihydroxy-D (1,25(OH) 2D) induce directamente la síntesis de osteocalcina a través de

una regulación transcripcional mediante el receptor nuclear de vitamina D ^{157,160}, mientras que la vitamina K actúa como cofactor esencial en la carboxilación de la OC. La OC se somete a una modificación postraducciona l llevada a cabo por la enzima conocida como GG CX que es vitamina K dependiente. Esta modificación postraducciona l consiste en la adición de residuos glutam il en las posiciones 17, 21 y 24, lo cual provoca un cambio conformacional que estabiliza la proteína y le confiere afinidad por el calcio y la hidroxiapatita del hueso ¹⁵⁷. Dependiendo del grado de carboxilación de la OC tendremos OC carboxilada (OCc) y OC descarboxilada (OCdc)¹⁵⁷.

1.5.2 Función

Posterior a su síntesis la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso, pero pequeñas cantidades se liberan a la circulación considerándose un marcador de formación ósea ¹⁶¹.

Sin embargo la fracción descarboxilada con menos de 3 residuos carboxilados, tiene una menor afinidad por el hueso. Así, una mayor proporción de OCdc se encuentra en la circulación pudiendo actuar de forma directa sobre otras células, entre las que destacan las células β pancreáticas y el adipocito ¹⁶². Estos hallazgos, han dado lugar a un nuevo concepto del hueso como órgano endócrino mediante la secreción de OC, que actúa incrementando la secreción de insulina, disminuyendo el nivel de glucosa plasmática, aumentando la sensibilidad a la insulina y el gasto energético (figura 12) ^{163,164}.

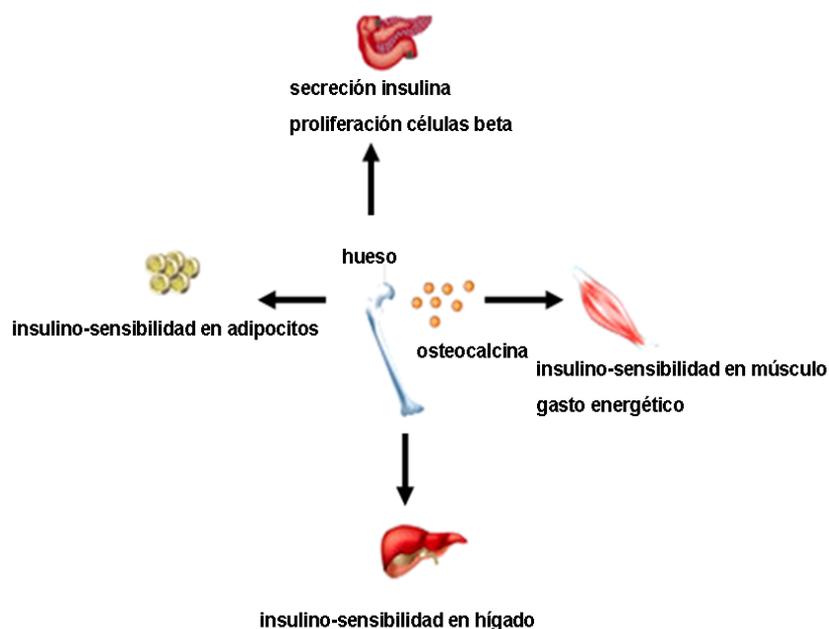


Figura 12. Función endócrina de la OC. Estimula la secreción de insulina y la proliferación de células β en el páncreas, aumenta el gasto de energía por el músculo y la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo, músculo y el hígado. Esquema realizado por la autora.

Las mutaciones en la GGCX podrían conducir a una actividad enzimática anormal ¹⁶⁵ y de forma concomitante modificar su actividad carboxilasa.

De esta forma, la inactivación de la OC en ratones conlleva a un incremento de la grasa visceral con intolerancia hidrocarbonada, concentraciones bajas de insulina, alteraciones en la respuesta insulínica a la glucosa y descenso de la masa de células beta pancreáticas ¹⁶⁴. Estos signos se asocian con el descenso de los niveles séricos de adiponectina, adipoquina conocida por mejorar la insulinosensibilidad.

También se sabe que la OCdc es un marcador clínico del estado de la vitamina K ¹⁶⁶, así la deficiencia de vitamina K conduce a un incremento de la OCdc circulante. Tanto la deficiencia de vitamina K como el gen rs699664 SNP en la GGCX se han asociado con el metabolismo óseo y la homeostasis vascular ¹⁶⁷⁻¹⁷⁰.

Además de participar en la mineralización del hueso, la OC se ha asociado con la calcificación vascular ¹⁷¹, se la ha descrito como un nuevo regulador de vías metabólicas ¹⁷² y es

también un contribuyente activo a la calcificación extraósea. Entre otros, la OC promueve la estimulación de la diferenciación y mineralización de CMLV ¹⁷³.

Los estudios moleculares han demostrado que la OC se puede encontrar en las placas ateroscleróticas ¹⁷⁴ y se ha sugerido que su presencia en el plasma puede servir como una fuente de OC, que a su vez puede contribuir a la calcificación de la pared ¹⁷⁵. De acuerdo con estos resultados, un estudio reciente ha informado que la OCdc podría ser un nuevo marcador biológico de la calcificación carotídea en hipertensos ¹⁷⁶.

La OCdc, al no poseer las tres posiciones carboxiladas no tiene afinidad por la hidroxiapatita del hueso y es liberada a la circulación. Mayores concentraciones de OCdc se asocian a fragilidad ósea y a un incremento del riesgo de sufrir fracturas ¹⁶⁰.

En animales de experimentación se ha observado que la OCdc mejora la secreción de insulina en las células beta del páncreas y mejora así la sensibilidad a la insulina ¹⁶³. Los estudios clínicos realizados en población adulta son compatibles con los resultados en animales ¹⁷⁷⁻¹⁸⁰, pues relacionan la OC con una disminución de la cantidad de masa grasa, el metabolismo de la glucosa, disminución de la severidad de la obesidad y con la DM 2 ¹⁸¹. Se ha descrito que parte de los efectos positivos de la OC en el metabolismo son mediados por la estimulación de la secreción de adiponectina en los adipocitos ^{182,183}.

1.5.3 Valores de referencia en sangre

Hay varios métodos de laboratorio para la medición de la OC, que pueden diferir en diversos aspectos, incluyendo el reconocimiento de las formas de OC (OC total, OCc y OCdc) ¹⁵⁷. Es muy importante establecer los intervalos de referencia específicos del método y la presencia de factores que pueden interferir en la medición para interpretar adecuadamente los niveles de OC en suero.

Las concentraciones circulantes de OC total varían con la edad, aumentan los niveles durante el primer año de vida y con la pubertad. Además se correlaciona con la velocidad de

crecimiento en la pubertad. Se ha descrito un ritmo circadiano en niños de tal modo que los niveles más elevados son por la mañana. Su concentración es 10 a 20 veces más elevada en niños comparada con la de las mujeres premenopáusicas ¹⁵⁷.

En un estudio realizado por Cioffi y col. (1997) determinaron los niveles de OC total en 1934 niños y adolescentes sanos entre 1 y 16 años de edad para establecer los valores de normalidad según la edad. En los niños entre 1 y 11 años de edad, los valores de la mediana de las concentraciones de OC total fue $< 88.5 \mu\text{g/L}$. En las niñas a partir de los 12 años los niveles en sangre disminuyeron significativamente hasta los 16 años con concentraciones de OC total de $38.5 \mu\text{g/L}$, alcanzando los valores de las mujeres adultas saludables en la edad. En niños este descenso ocurrió 2 años más tarde, a partir de los 14 años la mediana de concentración de OC total fue de $86.5 \mu\text{g/L}$ y a los 16 años fue de $45.2 \mu\text{g/L}$ ¹⁸⁴.

1.5.4 Osteocalcina y enfermedad cardiovascular

El conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos comunes compartidos por la patología vascular y el metabolismo óseo es uno de los campos en el que más se ha avanzado recientemente. Diferentes proteínas producidas por las células óseas, como la OC, la osteopontina, la osteoprotegerina (OPG), el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa- β (RANKL) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), están presentes en lesiones ateroscleróticas ¹⁸⁵. Además, también se ha demostrado la presencia de células de estirpe osteoblástica en la pared vascular ¹⁸⁶.

La influencia de estos factores óseos en la patogenia de la ECV se ha puesto de manifiesto a través de estudios en modelos animales. Ratones *knockout* para la proteína Gla de la matriz ósea (MGP), proteína de amplia distribución tisular, que incluye el hueso y la pared vascular, sufren una intensa calcificación vascular por lo que se ha atribuido a esta proteína un efecto inhibitor de la calcificación arterial ¹⁸⁷.

Aunque la OC se ha considerado clásicamente como un marcador de formación ósea, cada vez más se reconoce su papel como hormona. En modelos animales de enfermedad arterial periférica, la intensidad del daño vascular se relaciona con el número de células mononucleares con inmunorreactividad para OC ¹⁸⁸, por lo que podría estar relacionada con la afectación vascular.

En humanos, ésta relación entre concentraciones bajas de marcadores de remodelado óseo y la gravedad de la arteriosclerosis se ha ampliado recientemente. Así, la secreción de OC es paralela a la de MGP tanto en vasos normales como en placas de ateroma ¹⁸⁵. Kanazawa observó que las concentraciones séricas de OC han mostrado una correlación negativa con el GIMc en pacientes con DM 2 de raza asiática ¹⁷⁸. Además, pacientes adultos con ateromatosis carotídea y calcificación aórtica presentan concentraciones menores de OC respecto a controles sanos ¹⁸⁹.

Si bien, en los últimos tiempos se empieza a estudiar y conocer los efectos de la OC producida por los osteoblastos sobre la pared vascular, son necesarios más estudios para determinar el valor de la OC en el diagnóstico de la arteriosclerosis (Figura 13.).

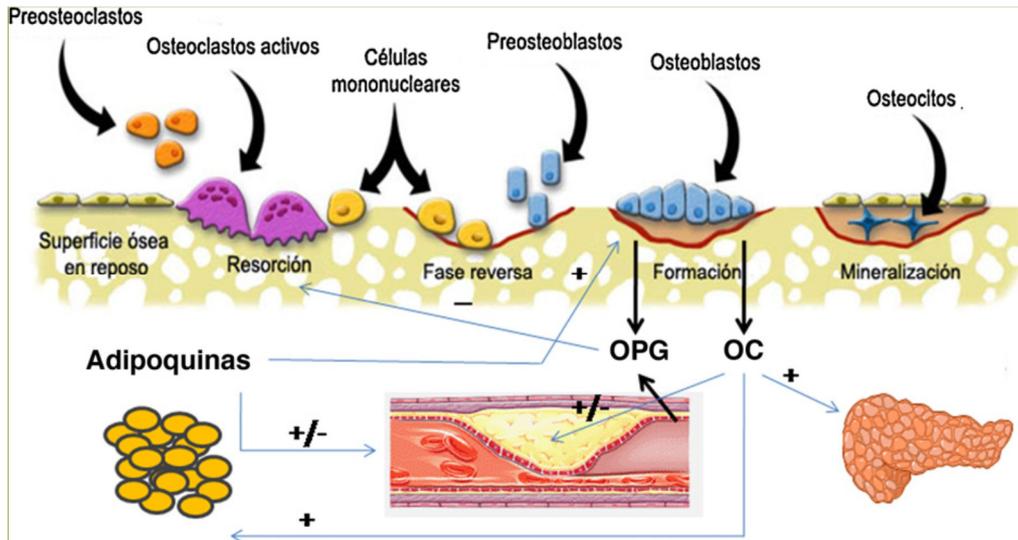


Figura 13. Representación esquemática de la interrelación entre células óseas, sistema vascular, tejido adiposo y metabolismo energético. Los osteoblastos son la fuente de la OPG y de OC. La OC ha demostrado ejercer efectos sobre el metabolismo energético: actúa sobre células beta del páncreas aumentando la sensibilidad a la insulina y estimula la secreción de adipocinas, a través de las cuales podría influir en la ECV. Puede acumularse en la pared vascular y participar en la mineralización vascular ¹⁶¹.

Diversos estudios han sugerido una relación entre la masa grasa y el metabolismo óseo basados en que el aumento de la densidad mineral ósea se asocia con un incremento de la masa grasa ¹⁹⁰. Hay que reseñar la importancia de la OC, molécula ósea que recientemente se ha relacionado no solo con una disminución de la cantidad de masa grasa ^{181,162}, sino mejorando la sensibilidad a la insulina ¹⁶³. No obstante, aún no está claro cuál es la forma molecular de la OC asociada con el metabolismo energético en humanos.

1.5.4.1 Osteocalcina y arteriosclerosis

Como referimos antes, en los últimos años ha cobrado relevancia el estudio del metabolismo óseo y su papel en el desarrollo de arteriosclerosis. Sabemos que las calcificaciones vasculares en la íntima arterial suelen asociarse con la existencia de placas ateroscleróticas previas. Estas afectan a la capa media de las arterias donde el calcio se acumula en las células del músculo liso vascular, produciendo rigidez y arteriosclerosis.

La OC se la ha relacionado con parámetros de arteriosclerosis en pacientes con DM 2, la velocidad de onda de pulso brazo-tobillo ^{174,178} y la enfermedad arteriosclerótica establecida ¹⁵⁷. Los estudios moleculares han demostrado también que la OC se puede encontrar en las placas de ateroma ¹⁷⁴ y se ha sugerido que su presencia en el plasma puede servir como fuente de calcificación de la pared del vaso ¹⁷⁵.

1.5.4.2 Relación entre la osteocalcina y la adiposidad

Un número creciente de estudios han indicado la presencia de vías comunes de activación entre metabolismo del tejido adiposo, energético y esquelético.

El enfoque principal hasta hace poco ha sido el de comprender cómo factores derivados de los adipocitos afectan el esqueleto. Algunos autores han reportado que el aumento de la masa grasa era un factor protector de la osteoporosis ^{191,192}, pero estudios recientes han desafiado este punto de vista y han observado que la masa grasa podría estar relacionada de manera inversa con la osteoporosis ¹⁹³.

Sin embargo, las funciones endócrinas de las proteínas derivadas de los osteoblastos liberadas en la circulación han sido poco estudiadas. Hasta aquí sabemos que la OC es producida específicamente por los osteoblastos y tiene varias propiedades hormonales, pero sus efectos endócrinos no están totalmente estudiados.

Por otra parte, se ha observado que la OC en plasma disminuye ligeramente después de comer, lo que sugiere que podría tener algún papel en la regulación metabólica ¹⁹⁴.

Lee y col. (2007) demostraron que la OC afecta a la adiposidad y a la homeostasis de la glucosa en ratones, esto indica que el esqueleto a través de un mecanismo endócrino influye en el metabolismo energético. Los ratones con deficiencia de OC mostraron obesidad, hiperglicemia, intolerancia a la glucosa y RI. Cuando se administró OC a estos ratones disminuyó la glucosa y aumentó el nivel de insulina en sangre ¹⁶³. Estos hallazgos en ratones representan la evidencia de una nueva vía de las funciones de la OC, la cual, además de

participar en el remodelado óseo tiene actividad de hormona metabólica y de regulación de la homeostasis de la glucosa.

En niños se desconoce la relación entre las proteínas derivadas de los osteoblastos como la OC con factores endocrinos y parámetros que reflejan el metabolismo energético.

1.5.4.3 Osteocalcina y síndrome metabólico

En modelos animales se ha señalado que la OC actúa sobre las células β pancreáticas y del tejido adiposo aumentando la secreción de insulina, la proliferación de las células β , regulando la masa grasa corporal y la expresión génica de la adiponectina ¹⁶³.

Además, estudios posteriores han demostrado que la OC puede tener un papel importante en la prevención del desarrollo de la DM 2 en ratones de tipo salvaje, lo que sugiere un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades metabólicas ^{162,195}. De acuerdo con estas observaciones, la evidencia en humanos ha demostrado que los niveles de OC en suero se asociaron inversamente con los niveles de glucosa en la sangre y positivamente con la secreción y la sensibilidad a la insulina ^{196,197}.

Se ha sugerido que los niveles de OC en suero están inversamente relacionados con fenotipos dismetabólicos tales como la dislipemia aterogénica, obesidad abdominal, SM y el aumento de velocidad de la onda de pulso braquial-tobillo y del GIMc ¹⁹⁸⁻²⁰¹.

Mientras que algunos estudios han sugerido que la OC total es una molécula protectora de ECV ^{202,203}, otros han encontrado que el aumento de OC total en suero se relaciona con una mayor prevalencia de arteriosclerosis carotídea ²⁰⁴⁻²⁰⁶. En este contexto, informes recientes indican que la OCdc es la fracción asociada a la calcificación de la arteria carótida en sujetos con hipertensión ¹⁷⁶ y SM ²⁰⁷.

Según lo descrito por varios autores, la OCdc tiene efectos endocrinos en el tejido adiposo, consiste en la reducción de la masa de grasa ¹⁶³, en la regulación positiva de la expresión de adiponectina ¹⁶² y en la secreción de insulina ¹⁶³. Recientemente se ha informado

que una proporción relativa de OCdc, pero no la OC total, estaba relacionada con parámetros endocrinos dependiendo del peso corporal, en niños prepúberes ¹⁷².

El aumento del riesgo de ECV se ve comúnmente en pacientes con SM ^{62,63}. La presencia de factores de RCV también se ha demostrado en los hijos de las familias con SM, lo que puede exponer a estos niños a un riesgo más alto y más temprano de padecer ECV ^{79,80}. De hecho, varios autores han estudiado la presencia de factores de riesgo metabólicos familiares para predecir futuros eventos cardiovasculares en la descendencia ^{79-82,123}. En nuestro trabajo nos hemos propuesto investigar si los niveles de OC en sangre se ven influenciados por la presencia de antecedentes familiares de SM en niños sanos prepuberales.

2 HIPÓTESIS

Hipótesis 1:

Hipotetizamos que las concentraciones séricas de PCR (marcador de inflamación de bajo grado) se relacionan con marcadores de RCV en niños prepuberales sanos como el IMC, el perímetro de cintura, PAS, PAD, grasa corporal, insulina, HOMA-IR, triglicéridos, colesterol HDL y marcadores de arteriosclerosis preclínica como el GIMC. La asociación de la PCR y el GIMC puede ser modificada por el grado de peso corporal.

Hipótesis 2:

Hipotetizamos que las concentraciones séricas de OCdc (marcador de metabolismo óseo) se relacionan con marcadores de RCV en niños prepuberales sanos el IMC, el perímetro de cintura, PAS, PAD, grasa corporal, insulina, HOMA-IR, triglicéridos, colesterol HDL y marcadores de arteriosclerosis preclínica como el GIMC. La asociación de la OCdc y el GIMC puede ser modificada por la presencia de antecedentes familiares de SM.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar si las concentraciones séricas de PCR y de OCdc son marcadores de arteriosclerosis preclínica en la edad pediátrica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estudiar si las concentraciones séricas de PCR se relaciona con el GIMc, marcador de arteriosclerosis preclínica, en niños sanos prepuberales.
- 2- Estudiar si el grado de peso corporal modifica la asociación entre la PCR y el GIMc.
- 3- Estudiar si las concentraciones séricas de OCdc se relacionan con el GIMc en niños sanos prepuberales.
- 4- Estudiar si la presencia de antecedentes familiares de SM modifican la asociación entre la OCdc y el GIMc.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño

Estudio clínico observacional transversal en la población pediátrica de referencia de los Centros de Salud de l'Alt Empordà (Girona).

4.2 Consideraciones éticas

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital de Girona Dr. Josep Trueta (comité de referencia). Se recogió un consentimiento informado de los tutores legales de todos los niños incluidos en el estudio. En todo momento se respetaron los principios fundamentales de la declaración de Helsinki así como la legislación vigente sobre la confidencialidad de datos personales y las normas éticas sobre estudios clínicos en pacientes pediátricos.

4.3 Sujetos de estudio

Se estudiaron en total 203 niños caucásicos de edad escolar (101 niños y 102 niñas, edad media 7.5 años), que se clasificaron según el grado de peso corporal determinado a partir del IMC [valor Z de $IMC < 0$ ($n=103$) y valor Z de $IMC > 0$ ($n=100$)] y según los antecedentes familiares de SM [descendientes de familias sin SM (MetS-, $n= 104$) y descendientes de familias con SM (MetS+, $n= 99$).

El rango de edad estudiado se determinó entre 5-10 años para coincidir con la visita del niño sano y poder realizar la inclusión de los niños de estudio desde los Centros de Atención Primaria. Además, durante este periodo de edad el cuerpo experimenta un incremento de tejido adiposo llamado "rebote adiposo", que está relacionado con la obesidad en la edad adulta. Este rango de edad nos permitió también excluir a los niños puberales, pues es conocido que presentan cambios importantes en la sensibilidad a la insulina y en la distribución de la grasa corporal durante este periodo de desarrollo. Los sujetos se incluyeron en distintos centros de atención primaria (CAP) de referencia de la comarca del Alt Empordà (Figura 14). La distribución por zonas demográficas fue la siguiente: en el área correspondiente

al CAP de La Escala se incluyeron 79 niños (38.9%), en el CAP de Vilafant 62 niños (30.5%), en el CAP de Figueres 50 niños (24.6%) y en el CAP de Roses 12 niños (5.9%).

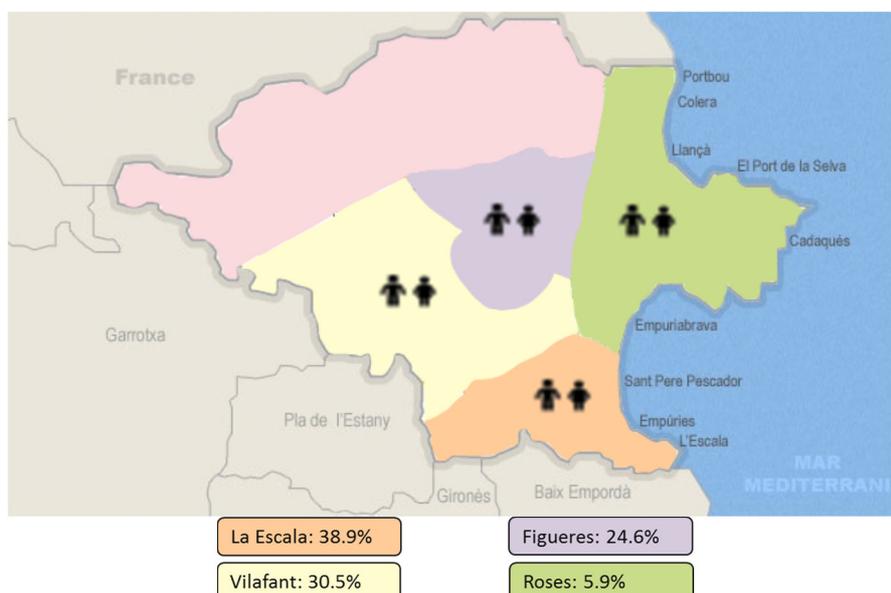


Figura 14. Áreas de distribución de los CAP incluidos en el estudio. (Imagen modificada por la autora).

Se considera que para que una muestra sea representativa de la población a estudiar es necesaria una participación superior al 80%, en nuestro estudio la participación máxima fue del 50% al 70%. Asumimos, también que hayamos podido excluir de la muestra a aquellos pacientes que solo hicieran uso de un sistema privado de atención sanitaria. En todo caso, las características antropométricas (peso, talla e IMC) de los niños que finalmente se incluyeron en la muestra de estudio demostraron seguir un patrón poblacional, por lo que consideramos que el posible sesgo de selección haya sido realmente bajo. Además, todos los niños estaban sanos y tenían todos los parámetros metabólicos dentro de los valores de normalidad.

4.4 Criterios de inclusión y exclusión de los sujetos

4.4.1 Criterios de inclusión

- Niño/a prepuberal de entre 5 y 10 años de edad de las áreas básicas de referencia cuyos padres aceptaron que participara en el estudio.
- Ausencia de signos de pubertad según los criterios de Tanner y Marshall ^{208,209}.

4.4.2 Criterios de exclusión

Niño/a prepuberal con enfermedad crónica grave, enfermedad crónica de carácter inflamatorio o enfermedad aguda intercurrente, consumo de corticoides, antibióticos o antiinflamatorios en los 15 días previos al estudio. En estos últimos supuestos, se retrasó la inclusión del niño hasta haber transcurrido 15 días del proceso intercurrente o del fin del uso de medicación.

- Recuento sanguíneo anormal, o con alteración de la función hepática o renal o tiroidea.
- Anomalías congénitas.
- Niños con criterios diagnósticos de SM de acuerdo con la IDF ⁷¹.
- Niños con imagen de placa arteriosclerótica en la ecografía, definida como el aumento del GIM en al menos un 50% en relación con la pared vascular contigua⁶⁰.

4.5 Variables

4.5.1 Variables clínicas

El examen clínico y la recolección de la muestra de sangre se realizaron en todos los pacientes entre las 8:00 y las 9:00 horas de la mañana en condiciones de ayuno. Se realizó una exploración física para valoración del estado general del niño. El examen clínico constó de las siguientes determinaciones:

- Peso: Expresado en gramos. La báscula utilizada es de marca Atlántida calibrada antes de cada determinación. Los niños se pesaron en ropa interior y sin zapatos.
- Talla: La altura se midió con los niños sin zapatos en bipedestación y en condiciones estandarizadas con la cabeza situada en el plano de Frankfurt (plano horizontal nariz-trago). El tallímetro de Harpenden está fijado e incorporado en la báscula con el plano superior móvil con una precisión de 1 milímetro.

- IMC: Índice de masa corporal o Quetelet (relación peso/altura):
$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{Talla}^2 (\text{m}^2)$$
- Se calcularon los valores estandarizados por edad y sexo (valores Z) para el peso, la altura y el IMC en niños utilizando valores de referencia regionales ²¹⁰.
- Medición de perímetro de cintura: Con una cinta métrica graduada en centímetros se mide el perímetro siguiendo una línea que pasa por el ombligo con el niño en posición de decúbito supino respirando relajadamente y con los brazos en posición anatómica. Se midió tal como lo realiza la Sociedad Española de Estudio de la Obesidad (SEEDO) ²¹¹.
- Presión arterial: Se midió antes de la extracción de sangre en posición supina en el brazo derecho después de 10 minutos de reposo, se utilizó un esfigmomanómetro electrónico (Dinamap Pro 100, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom) con el tamaño del manguito adecuado para la circunferencia del brazo.
- Grasa corporal: La composición corporal (masa grasa, masa magra y agua corporal) se midió con un aparato de impedancia bioeléctrica (Hydra Bioimpedance Analyzer 4200, Xitron Technologies, San Diego, CA) siguiendo la metodología descrita previamente en niños prepuberales. Se trata de una técnica no invasiva que ha sido utilizada y validada en niños cuyas mediciones se correlacionan bien con datos de absorciometría dual de rayos X (DXA) ²¹².
- GIMc y grasa visceral: Para obtener las imágenes ecográficas y efectuar las mediciones tanto de la GIMc como de la grasa visceral, se utilizó un ecógrafo de alta resolución (MyLabTM25, Esaote, Firenze, Italy). Se midió el espesor de la íntima-media carotídea siguiendo las normas del consenso del año 2008 americano y europeo (Figura 15) ^{17,29}. Se obtuvieron las imágenes del GIMc durante la diástole cardíaca. Se utilizó un transductor lineal de 12 MHz aplicado en

el lado derecho del cuello con el paciente en decúbito supino, con la cabeza girada hacia la izquierda se localizó la arteria carótida común a 1 cm de distancia de su bifurcación. Se utilizó la media de cinco mediciones consecutivas del espesor de la arteria carótida para el estudio.

Posición del paciente	Decúbito supino con el cuello ligeramente hiperextendido y rotado 45° en dirección opuesta al lado que se va a tomar la medición.
Territorios a explorar	Carótida común
Definición de GIM	Es el espesor de la íntima media. Está formada por dos líneas paralelas que definen dos límites anatómicos: la interfase lumen-íntima y medio-adventicia.
Definición de placa de ateroma	Estructura focal que invade el lumen arterial de al menos 0,5 mm o el 50% del valor del GIM, o bien un valor desde la interfase media-adventicia a la interfase íntima-lumen superior a 1,2 mm ⁶⁰
Cómo tomar las mediciones	El sistema debe estar perfectamente calibrado para proporcionar mediciones exactas de GIM Se debe medir la distancia entre la línea ecogénica que limita con el lumen que es la íntima hasta el inicio de la próxima línea ecogénica que corresponde a la adventicia del vaso.

Figura 15. Recomendaciones para la medición del GIMc según los consensos europeo y americano^{29,17}.

Para la medición de la grasa visceral hemos utilizado la grasa perirrenal. Se obtuvieron imágenes con el niño respirando relajadamente en posición supina, al final de la espiración no forzada. Se realizó con el transductor convex de 3.5 a 5.5 MHz. Se utilizó la media de tres medidas consecutivas para el estudio. Se calculó el grosor de la capa de grasa de la fosa renal posterior en el espacio perirrenal derecho, como lo describieron Hirooka y col. (2005)²¹³ (Figura 16). La grasa visceral medida por ecografía se relaciona bien con la medida realizada por tomografía computarizada^{213,214}.

Todas las medidas ecográficas se tomaron por un solo observador, el cual desconocía las características clínicas y de laboratorio de los participantes. Los coeficientes de variación intra e inter-observacional para las medidas ecográficas fueron inferiores al 6%.

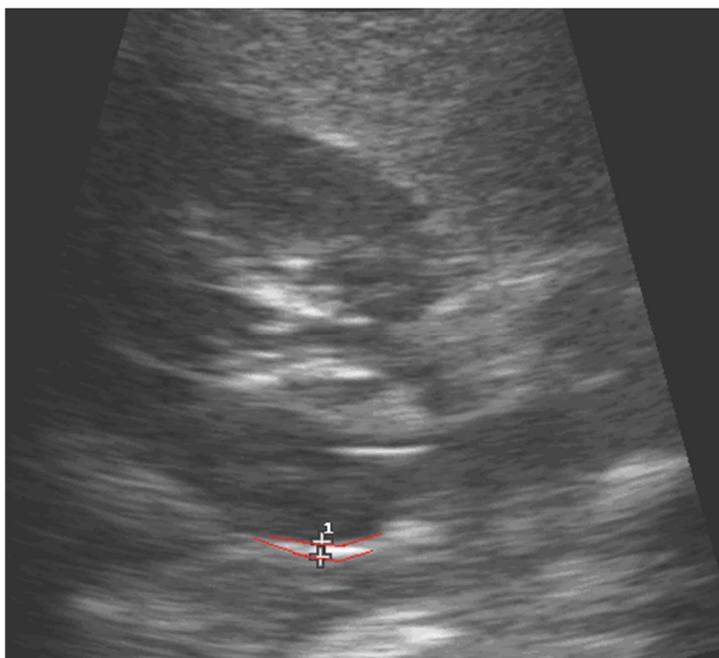


Figura 16. Medición ecográfica de la grasa perirrenal: la línea roja marca los límites de la grasa (hiperecogénica) que rodea al riñón derecho, en la zona más posterior. (Imagen realizada por la autora).

4.5.2 Variables analíticas

A los sujetos en el estudio se les practicó una extracción de sangre venosa (total máximo de 15 ml) en el momento de la inclusión. Todas las muestras de sangre se obtuvieron entre las 8:00 y las 9:00 horas de la mañana en condiciones de ayuno.

A continuación, a cada niño se le realizó una analítica general (ver abajo) y se conservó la muestra en una plasmoteca y seroteca que se mantuvo a -80°C .

Todas las extracciones se realizaron en un ambiente tranquilo y en el caso de los niños, después de haberles aplicado una crema anestésica EMLA en la piel, que es de uso habitual en pediatría, y con personal experimentado que minimizaron las molestias de la punción.

- **Analítica general**

Se analizaron las variables de laboratorio de rutina: hemograma, bioquímica, inmunología y hormonas. Estas variables de laboratorio se llevaron a cabo diariamente con la inclusión de cada individuo, en el Laboratorio Clínico del Hospital de Figueres.

La glucosa se midió en suero por el método de la glucosa oxidasa. La insulina se midió también en suero por immunoquimioluminiscencia (IMMULITE 200, Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Los límites de detección fueron de 0.4 mIU/L y el coeficiente intra- e inter-ensayo fue menor que el 10%.

Se utilizó el método de Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR, Mathews , 1985)²¹⁵ para estimar la sensibilidad a la insulina en las muestras de suero obtenidas. Estos parámetros han sido validados en diversas poblaciones pediátricas. No se realizaron pruebas dinámicas de sensibilidad o secreción de insulina en ningún individuo del presente estudio.

El colesterol total y el colesterol HDL se cuantificaron utilizando el método homogéneo del detergente selectivo con acelerador. Los triglicéridos totales en suero se cuantificaron monitoreando la reacción de oxidasa y peroxidasa de glicerol fosfato. Todos estos parámetros fueron analizados en una muestra fresca de suero en el analizador C-8000 de Abbot (Abbot Park, IL, US), con unos CV intra- e inter-ensayo inferiores al 10%.

- **Elaboración de una seroteca y una plasmoteca**

Para obtener el plasma se recogió la muestra de sangre venosa en un tubo de centrífuga estéril con EDTA (anticoagulante). Inmediatamente después, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 3°C a 4°C. Una vez centrifugado se separó el plasma y la fracción celular (mayoritariamente leucocitos).

Para obtener suero se recogió la muestra de sangre en un tubo de centrífuga estéril sin anticoagulante. Se dejó reposar la muestra durante 30 minutos y luego se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Como el tubo no tiene incorporado ningún anticoagulante se obtiene el suero del sobrenadante.

Se hicieron alícuotas de 300µl a 400µl tanto del plasma como del suero en microtubos. Así se evitaron un gran número de ciclos de congelación- descongelación de las muestras en posteriores estudios. Estas alícuotas fueron etiquetadas correctamente con el código de la

muestra, la fecha, su contenido y guardadas a 80°C en sus correspondientes cajas, para un almacenamiento de larga duración.

4.5.3 Variables específicas

4.5.3.1 Proteína C reactiva ultrasensible

Las concentraciones séricas de la PCRus se midieron en el laboratorio clínico utilizando la técnica inmunoensayo ultrasensible de látex CRP Vario (Sentinel Diagnostics, Abbott Diagnostics Europe, Milan, Italy). El límite inferior de detección fue de 0.2 mg/L y los CV intra e interensayo fueron inferiores al 3%. Todos los valores inferiores a 0.2 mg/L se codificaron como 0.2. Los niños con valores de PCRus superiores a 5.0 mg/L se excluyeron del estudio ya que estaban por encima del valor de referencia normal para este test ²¹⁶.

4.5.3.2 Osteocalcina total

Para determinar cuantitativamente la concentración de OC total en suero se utilizó el kit "*N-Mid*[®] *osteocalcin ELISA*" de Nordic Bioscience Diagnostics, con referencia 3OSC4000. Este kit nos permitió medir tanto la forma intacta como el fragmento N- MID de las formas carboxilada y descarboxilada de la proteína.

Este kit está basado en la utilización de dos anticuerpos monoclonales altamente específicos contra la OC humana. El anticuerpo captura reconoce la región media (aa 20-29) mientras que el de detección es un anticuerpo conjugado con una peroxidasa que reconoce la región N-terminal (aa 10-16). Por lo tanto, además de la OC intacta (aa 1-49) también se detectaron los fragmentos N-Mid (aa 1-43).

• Protocolo

Primero se pipetearon 20 µl de los estándares, las muestras de concentración desconocida y los controles en los pocillos correspondientes que ya contienen el anticuerpo de captura. A continuación, se añadieron 150 µl de la mezcla del anticuerpo biotinilado y el anticuerpo conjugado con la peroxidasa. Se selló la placa y se incubaron las muestras a

temperatura ambiente durante 2 horas sin agitación. Pasado este tiempo, se lavaron 5 veces las placas con 200 μ l de solución de lavado. Después se añadieron 100 μ l del sustrato cromogénico de tetrametilbenzidina (TMB) y se incubó durante 15 minutos aproximadamente en oscuridad (por ejemplo envolviendo la placa con papel de aluminio). Esta reacción colorimétrica, fue parada con la adición de 100 μ l de ácido sulfúrico (solución stop). Finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia a 650 nm. En este caso, los estándares se ajustaron a una recta por mínimos cuadrados y las concentraciones de las muestras se calcularon para la interpolación a esta recta.

- **Características del ensayo**

El rango de la curva estándar fue de 0.5 ng/ml a 100 ng/ml. El límite de detección fue de 0.5 ng/ml de OC. El coeficiente de variación fue menor del 5%. La capacidad total del ensayo es de 96 cuantificaciones y se necesitan 20 μ l de suero sin diluir en duplicados, una recta patrón y controles y blancos en cada ensayo. La duración del ensayo fue de aproximadamente dos horas y media. No se conocen interferencias con el ensayo, por lo tanto es específico para la OC total. Para evitar la contaminación de las muestras, usamos puntas de micropipetas automáticas de un solo uso.

Dado que las concentraciones de OC varían con la edad de la persona y el ritmo circadiano, con las tasas de filtración glomerular y la medicación, hemos llevado a cabo el estudio con una población homogénea y en la que se extrajo la muestra siempre a la misma hora del día, preferiblemente a primera hora y en ayunas.

4.5.3.3 Osteocalcina descarboxilada

Para llevar a cabo la determinación cuantitativa de la forma descarboxilada (OCdc) de los fragmentos de OC N-Mid, mid C-terminal e intacta en suero se ha utilizado un kit comercial de inmunoensayo enzimático in vitro denominado "*Undercarboxylated Osteocalcin (Glu -OC) EIA kit*" con número de catálogo MK 118 de TakaraBio. Este kit utiliza anticuerpos monoclonales específicos altamente reactivos contra la forma OCdc y con muy baja reactividad

por las posiciones γ -carboxiladas números 17, 21 y 24 de la OC. El inmunógeno del primer anticuerpo va desde el péptido de la posición 14 al 30 y el epítoto es probablemente el residuo de ácido glutámico de la posición 21 y 24. Mientras que el segundo anticuerpo reconoce el residuo aminoacídico desde la posición 21 a la 31.

• Protocolo

El kit de inmunoensayo enzimático (EIA) de la OCdc consiste en un EIA de fase sólida basado en el método de sandwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales de ratón anti-OCdc para detectar la forma descarboxilada en dos pasos. Uno de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-OCdc estaba inmovilizado en la placa bloqueada contra uniones no específicas. A continuación, 100 μ l de las muestras diluidas seis veces y los estándares fueron añadidos directamente a cada pocillo e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación suave. El segundo paso consistió en lavar la placa tres veces con 400 μ l de PBS y añadir 100 μ l del segundo anticuerpo anti-OCdc marcado con la peroxidasa y se incubó una hora a temperatura ambiente y agitación suave. Durante esta incubación, la OCdc se unió al anticuerpo anti-OCdc de la placa y fue marcada por la peroxidasa (POD). Pasada esta hora se lavó de nuevo la placa tres veces con 400 μ l de PBS y se añadieron 100 μ l del sustrato de la POD que consistieron en H_2O_2 y 3.3', 5.5' TMB durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. La reacción entre la POD y el TMB resultó en el desarrollo de color amarillo para la POD. La cantidad de color fue proporcional a la cantidad de OCdc presente en las muestras y los estándares.

Para poder cuantificarlo se paró la reacción con 100 μ l de solución stop (1N H_2SO_4). Finalmente ya se pudo medir la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA para obtener la absorbancia de cada una de las muestras. Esta absorbancia sirvió para obtener las concentraciones de OCdc de cada muestra.

Mediante una recta de 4 parámetros (curva sigmoideal) creada con los estándares y por interpolación de la absorbancia de nuestras muestras en ésta, se obtuvieron las

concentraciones en ng/ml. Esta concentración se multiplicó por seis, que es el factor de dilución para obtener la concentración real de OCdc de las muestras.

- **Características del ensayo**

El rango de la curva estándar fue de 0.258 ng/ml a 8 ng/ml. El límite de detección fue de 0.258 ng/ml y el CV fue del 6%. La capacidad total del ensayo es de 96 cuantificaciones y se necesitan: 110 µl del volumen final (dilución 1:16) en duplicados, una recta patrón y controles y blancos en cada ensayo. La duración del ensayo fue aproximadamente tres horas y media. El kit mide específicamente OCdc con un 5% de reactividad cruzada con la forma carboxilada de la OC humana. Para evitar la contaminación de las muestras usamos puntas de micropipetas automáticas de un solo uso.

4.5.3.4 Osteocalcina carboxilada y porcentaje de osteocalcina descarboxilada

La OCc fue calculada como la diferencia entre la OC total y la OCdc. Para obtener el porcentaje de OCdc se dividió la OCdc por la OC total y se multiplicaron los valores por 100.

4.5.4 Antecedentes familiares de síndrome metabólico

Para cada niño, ambos progenitores fueron pesados, medidos y se les tomó una muestra de sangre. La historia familiar de SM fue diagnosticado siguiendo los criterios de la IDF ⁷¹. El SM en los padres se definió si el IMC era mayor a 30 kg/m² y tenían dos o más de las siguientes alteraciones: 1) los triglicéridos en suero superiores a 150 mg/dl; 2) el colesterol HDL menor de 40 mg/dL en hombres o menor de 50 mg/dl en mujeres; 3) tensión arterial mayor de 130/85 mmHg y 4) la glucosa en suero en ayunas superior a 100 mg/dl.

El SM de los abuelos se evaluó mediante un cuestionario autoadministrado. En estos sujetos, se definió el SM si se comunicaron al menos 2 de las siguientes anomalías: 1) el sobrepeso; 2) el aumento de las concentraciones de lípidos en suero o el uso de hipolipemiantes; 3) la presión arterial alta de manera repetida o el uso de medicamentos

antihipertensivos; 4) el aumento de la glucosa en sangre de manera repetida o del uso de agentes hipoglucemiantes.

Los sujetos fueron clasificados como familias con antecedentes de SM (MetS+) cuando al menos uno de los padres o dos abuelos se vieron afectados por la enfermedad ²¹⁷.

4.6 Recogida y análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Los resultados se expresan como la media y el intervalo de confianza del 95 %. Se comprobó si las variables a estudiar seguían la distribución normal con el test de Kolmogorov-Smirnov. Todas aquellas que no la seguían, fueron transformadas logarítmicamente. Las diferencias en las variables clínicas, bioquímicas y vasculares entre los grupos de estudio fueron examinados mediante test-t por datos no apareados. La relación entre variables se analizó mediante correlación simple seguida de análisis de regresión múltiple para ajustar por posibles factores de confusión. La significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Proteína C reactiva y grosor de íntima media carotídea

5.1.1 Descripción de las variables clínicas y analíticas de la población de estudio agrupadas según el grado de peso corporal

Para este estudio se han analizados 203 niños prepuberales sanos de la población general (101 niños y 102 niñas), cuya edad media fue de 7.5 años. En la tabla 1 se representan las características clínicas y bioquímicas de todos los sujetos de estudio de acuerdo con el valor de la mediana del IMC: Valor Z del IMC > 0, valor Z del IMC ≤ 0.

Tabla 1 Variables clínicas y bioquímicas de los sujetos de estudio para la población total y en subgrupos de acuerdo con la mediana del valor Z del IMC

	Total (n=203)	Valor Z del IMC ≤ 0 (n=103)	Valor Z del IMC > 0 (n=100)	p
Variables				
Edad (años) media	7.5 (7.2; 7.8)	7.4 (7.1; 7.6)	7.6 (7.2; 7.8)	ns
Sexo femenino (%)	50	52	49	ns
Peso, Kg,	29.7 (28.3; 31.2)	23.4 (22.4; 24.2)	36.3 (34.3; 38.2)	<0.0001
Peso, z-score,	0.44 (0.25; 0.63)	-0.62 (-0.73; -0.51)	1.51 (1.30; 1.73)	<0.0001
Altura, cm,	126 (125; 127)	123 (121; 124)	130 (127; 132)	<0.0001
Altura, z-score,	0.32 (0.17; 0.47)	-0.14 (-0.35; 0.07)	0.79 (0.61; 0.96)	<0.0001
IMC kg/m ² ,	18.1 (17.6; 18.7)	15.2 (15.0; 15.5)	21.1 (20.4; 21.7)	<0.0001
IMC, z.score,	0.34 (0.16; 0.53)	-0.72 (-0.80; -0.63)	1.42 (1.21; 1.63)	<0.0001
Perímetro cintura, cm,	59.3 (57.8; 60.7)	51.9 (51.0; 52.7)	66.8 (64.8; 68.8)	<0.0001
PAS, mmHg,	103 (102; 105)	101 (100; 103)	105 (103; 108)	0.007
PAD, mmHg,	58 (57; 59)	56 (54; 58)	59 (58; 60)	0.033
Grasa corporal, %,	30.5 (29.2; 31.9)	25.7 (24.0; 27.5)	35.4 (33.9; 36.8)	<0.0001
GIMc, cm,	0.041 (0.040; 0.042)	0.039 (0.038; 0.041)	0.043 (0.041; 0.044)	0.01
Variables bioquímicas				
Glucosa, mg/dL,	86 (85;89)	85 (84;86)	87 (86;89)	0.026
Insulina, μUI/mL,	3.1 (2.6;-4,6)	1.9 (1.4; 2.3)	4.5 (3.6; 5.3)	<0.0001
HOMA-IR,	0.7 (0.58; 0.82)	0.40 (0.31; 0.50)	1.01 (0.80; 1.21)	<0.0001
Triglicéridos mg/dL,	57 (53; 61)	49 (46; 53)	65 (59; 72)	<0.0001
Colesterol HDL mg/dL,	58 (55; 59)	62 (59; 64)	53 (51; 56)	<0.0001
PCRus, mg/L,	1.14 (0.94; 1.34)	0.73 (0.53; 0.92)	1.56 (1.24; 1.88)	<0.0001
OC total (ng/mL)	69.2 (64.7; 73.7)	74.4 (66.7; 82.0)	63.9 (59.3; 68.5)	0.021
OCdc (ng/mL)	34.8 (32.4; 37.1)	33.1 (29.6; 36.4)	36.6 (33.3; 39.8)	0.141
Porcentaje de OCdc	52.3 (48.9; 55.7)	47.6 (42.4; 52.8)	57.2 (53.1; 61.3)	0.005

Los resultados de las variables cuantitativas se expresan como media e intervalo de confianza del 95%. GIMc: Grosor íntima-media carotídea; IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina; HDL: Lipoproteína de alta densidad; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; OC: Osteocalcina; OCdc: Osteocalcina descarboxilada.

Al separar la población por subgrupos de acuerdo con el valor Z del IMC (Tabla 1), se observan las diferencias esperables asociadas a la obesidad. Los sujetos con mayor IMC presentan mayor peso, altura, perímetro de cintura, PAD, grasa corporal, GIMc, glucosa, insulina, HOMA-IR, triglicéridos y menor colesterol HDL que los sujetos con menor IMC (todos entre $p < 0.0001$ y $p < 0.05$). Los niños con mayor IMC también presentan menores niveles séricos de OC total ($p = 0.021$) y mayor porcentaje de OCdc ($p = 0.005$) comparado con los niños con menor IMC. No hay diferencias significativas entre la edad y sexo.

La concentración sérica media de PCR en la población de estudio es 1.14 ± 0.2 mg/L. Los niños con mayor IMC presentan mayores niveles séricos de PCRus comparados con niños con menor IMC (1.56 ± 0.3 vs 0.73 ± 0.2 mg/L; $p < 0.0001$).

5.1.2 Asociación entre la proteína C reactiva y el grosor de la íntima media carotídea en la población general de niños sanos prepuberales

Se ha analizado la asociación entre la PCRus y los diferentes parámetros clínicos y analíticos estudiados en nuestra cohorte de niños sanos prepuberales de la población general (Tabla 2).

Tabla 2 Coeficientes de correlación de la PCRus con las variables seleccionadas para la población total de niños sanos prepuberales

PCRus, mg/L	Total (n=203)	
	R	p
Edad, años	0.195	0.006
IMC Z-score	0.527	<0.0001
Perímetro cintura, cm	0.518	<0.0001
Grasa corporal %	0.378	<0.0001
PAS, mmHg	0.238	0.001
PAD, mmHg	0.224	0.001
GIMc	0.369	<0.0001
Triglicéridos mg/dL	0.298	<0.0001
Colesterol HDL, mmol/L	-0,299	<0.0001
Insulina, μ UI/mL	0.358	<0.0001
HOMA-IR	0.367	<0.0001
OC total (ng/mL)	-0.138	ns
OCdc (ng/mL)	-0.020	ns
Porcentaje de OCdc	0.121	ns

GIMc: Grosor íntima-media carotídea; IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; OC: Osteocalcina; OCdc: Osteocalcina descarboxilada.

En la población de estudio, la PCRus se asocia positivamente con las variables metabólicas de RCV estudiadas, incluyendo el IMC, el perímetro de cintura, PAS, PAD, grasa corporal, insulina, HOMA-IR, triglicéridos, y negativamente con el colesterol HDL (todos entre $p < 0.05$ y $p < 0.0001$). Además se asocia de manera significativa con el GIMc ($p < 0.0001$), marcador de arteriosclerosis preclínica (Figura 17).

No se observan asociaciones entre la PCRus y parámetros del metabolismo óseo (concentraciones séricas de OC total y OCdc).

Para estudiar si la asociación que existe entre la PCRus y el GIMc es independiente de la obesidad y otras variables de confusión se ha realizado un análisis lineal multivariante con el GIMc como variable dependiente (Tabla 3).

RESULTADOS

Tabla 3 Modelo lineal multivariado del GIMc como variable dependiente en niños sanos prepuberales.

	GIMc		
	β	p	r ²
Población total (n=203)			
PCRus	0.261	0.003	14.5%
IMC	0.172	0.008	3.3%
Sexo	0.153	0.033	2.3%

Variables no predictoras: Edad, grasa corporal, triglicéridos y Colesterol HDL. GIMc: Grosor íntima-media carotídea; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; IMC: Índice de masa corporal.

Los coeficientes de regresión ajustados por edad, sexo, IMC, grasa corporal y lípidos séricos muestran que para la población total estudiada, la PCR es una variable predictiva del valor del GIMc. Los niveles de PCRus explican el 14.5% de la varianza del GIMc y el IMC el 3.3% de la varianza del GIMc.

Visto que el IMC influye también en el valor del GIMc, se ha realizado un análisis lineal multivariante con la PCRus como variable dependiente (Tabla 4). Corrigiendo por las posibles variables confusoras, se observa que el IMC y en menor medida el Colesterol HDL son variables predictoras del valor de la PCRus en la población general, las cuales explican el 29.8% y el 4.2% de la varianza de la PCRus, respectivamente.

Tabla 4 Modelo lineal multivariado de la PCRus como variable dependiente en niños sanos prepuberales.

	PCRus		
	β	p	r ²
Población total (n=203)			
IMC	0.529	<0.0001	29.8%
Colesterol HDL	-0.205	0.001	4.2%

Variables no predictoras: Edad, sexo, grasa corporal y triglicéridos. PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; IMC: Índice de masa corporal; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad.

5.1.2.1 Asociación entre la proteína C reactiva y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales según el grado de peso corporal

Se ha analizado la asociación entre la PCRus y los diferentes parámetros clínicos estudiados en subgrupos de la población según el grado de peso corporal determinado a partir del valor Z del IMC (Tabla 5).

Tabla 5 Coeficientes de correlación de la PCR con las variables seleccionadas en niños sanos prepuberales en subgrupos de acuerdo con el valor Z del IMC

PCRus, mg/L	Valor Z del IMC ≤0 (n=103)		Valor Z del IMC >0 (n=100)	
	r	p	r	p
Edad, años	0.039	ns	0.267	0.007
IMC z-score	0.190	ns	0.530	<0.0001
Perímetro cintura, cm	0.057	ns	0.547	<0.0001
Grasa corporal %	0.150	ns	0.331	0.001
PAS, mmHg	0.124	ns	0.228	0.023
PAD, mmHg	0.156	ns	0.230	0.022
GIMc	0.329	0.002	0.333	0.002
Triglicéridos mg/dL	0.167	ns	0.242	0.015
Colesterol HDL, mmol/L	-0.220	0.027	-0.169	ns
Insulina, µUI/mL	0.116	ns	0.339	0.001
HOMA-IR	0.141	ns	0.356	<0.0001
OC total (ng/mL)	-0.087	ns	-0.131	ns
OCdc (ng/mL)	-0.153	ns	0.021	ns
Porcentaje de OCdc	-0.040	ns	0.138	ns

GIMc: Grosor íntima-media carotídea; IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; HDL: Lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; OC: Osteocalcina; OCdc: Osteocalcina descarboxilada.

En los niños con valor Z del IMC>0, la PCRus se asocia con las variables metabólicas de RCV estudiadas, incluyendo el IMC, el perímetro de cintura, PAS, PAD, grasa corporal, insulina, HOMA-IR, triglicéridos (todos entre $p<0.05$ y $p<0.0001$). En los niños con valor Z del IMC ≤0, la PCRus se asocia negativamente con el colesterol HDL ($p=0.027$).

La PCRus se asocia positivamente con el GIMC en ambos subgrupos de niños ($p=0.002$) (Figura 17).

No se observan asociaciones entre la PCRus y parámetros del metabolismo óseo (concentraciones séricas de OC total y OCdc) en ninguno de los subgrupos estudiados.

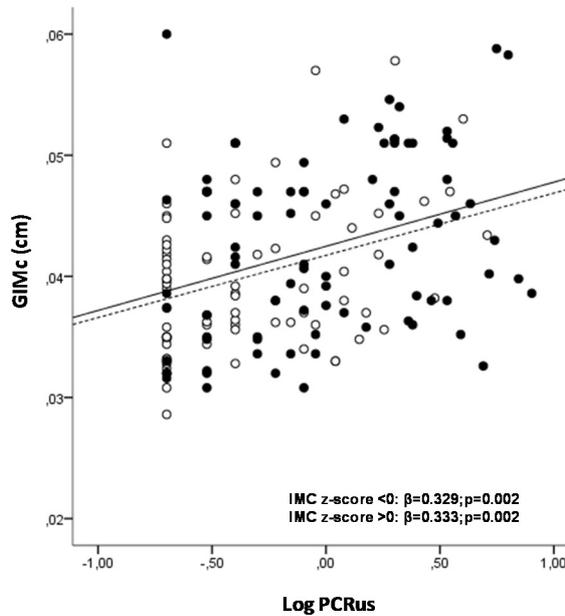


Figura 17. Correlación gráfica de la PCRus con el GIMc en niños sanos prepuberales. Los puntos negros y la línea continua de regresión representan los sujetos con valor Z del IMC>0. Los puntos blancos y la línea de puntos de regresión indican los sujetos con valor z de IMC≤0. Se muestran valores de β y de p a partir de análisis de regresión.

Para evaluar si la relación que existe entre la PCRus y el GIMc es independiente de la obesidad y de otras variables de confusión se ha realizado un modelo lineal multivariante por subgrupos según el valor Z del IMC con el GIMc como variable dependiente (Tabla 6).

Tabla 6 Modelo lineal multivariado del GIMc como variable dependiente en niños sanos prepuberales en subgrupos de acuerdo con el valor Z del IMC.

	GIMc		
	β	p	r ²
Valor Z del IMC ≤ 0 (n=103)			
PCRus	0.325	0.003	10.5%
Valor Z del IMC > 0 (n=100)			
PCRus	0.360	0.001	13.0%
IMC	0.330	0.002	11.1%

VARIABLES NO PREDICTORAS: Edad, grasa corporal, triglicéridos y colesterol-HDL. GIMc: Grosor íntima-media carotídea; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; IMC: Índice de masa corporal.

Los coeficientes de regresión ajustados por edad, sexo, IMC, grasa corporal y lípidos séricos, muestran que la PCRus es una variable predictora del valor del GIMc en los dos subgrupos estudiados. En el subgrupo de niños con menor IMC (valor Z del IMC ≤ 0) la PCRus explica el 10.5% de la varianza del GIMc. En el subgrupo de niños con mayor IMC (valor Z del IMC > 0), la PCRus y el IMC explican el 13.0% y el 11.1% de la varianza del GIMc, respectivamente.

Al igual que en el apartado anterior, dada a la gran importancia del valor del IMC en la varianza del GIMc, también se ha realizado un análisis lineal multivariante con la PCRus como variable dependiente para valorar el grado de implicación entre el IMC y la PCR (Tabla 7).

Tabla 7 Modelo lineal multivariado de la PCRus como variable dependiente en niños sanos prepuberales en subgrupos de acuerdo con el valor Z del IMC

	PCRus		
	β	p	r^2
Valor Z del IMC ≤ 0 (n=103)			
Colesterol HDL	-0.217	0.03	4.7%
Valor Z del IMC > 0 (n=100)			
IMC	0.576	< 0.001	33.2%

Variables no predictoras: Edad, sexo, grasa corporal y triglicéridos. PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; IMC: Índice de masa corporal; Colesterol HDL: Lipoproteína de alta densidad.

Al corregir por las posibles variables confusoras se observa que en el subgrupo de niños con mayor peso corporal (valor Z del IMC > 0), el IMC explica un 33.2% de la varianza de la PCRus. Sin embargo, en el subgrupo de niños con menor peso corporal (valor Z IMC ≤ 0) el colesterol HDL es la única variable que se asocia a la PCRus explicando el 4.7% de su variabilidad.

5.2 Osteocalcina y grosor de íntima media carotídea

5.2.1 Descripción de las variables clínicas y analíticas de la población de estudio agrupadas según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico

Para este estudio se han analizados los mismos 203 niños sanos (101 niños y 102 niñas) con edad media de 7.5 años. En la tabla 8 se representan las características clínicas y bioquímicas de todos los sujetos de estudio así como de subgrupos de acuerdo con la presencia de antecedentes familiares con SM (MetS-: ausencia de antecedentes de SM y MetS+: presencia de antecedentes de SM).

Al separar la población por subgrupos según la presencia de antecedentes familiares con SM se observa que los niños con antecedentes de SM (MetS+) tienen mayor peso, altura, IMC, perímetro cintura, grasa corporal, insulina, HOMA-IR , triglicéridos, y menor colesterol HDL que los niños sin antecedentes de SM (MetS-) (todos entre $p < 0.0001$ y $p < 0.01$) (Tabla 8).

Las concentraciones séricas de la PCRus y el GIMc también están aumentados en el grupo de niños MetS+ respecto al grupo MetS- ($p < 0.0001$ y $p < 0.001$, respectivamente).

En el grupo MetS+ los niveles de la OC total y OCdc están disminuidos ($p < 0.0001$ y $p < 0.01$ respectivamente) y el porcentaje de OCdc está aumentado ($p < 0.01$).

Tabla 8 Variables clínicas y bioquímicas de los sujetos de estudio para la población total y en subgrupos según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico

	Total (n=203)	MetS- (n=104)	MetS+ (n=99)	p
Variables				
Edad (años) media \pm SD	7.5 (7.2; 7.8)	7.5 (7.2; 7.8)	7.5 (7.2; 7.8)	ns
Sexo femenino (%)	50	48	51	ns
Peso, Kg,	29.7 (28.3; 31.2)	26.7 (25.4; 28.0)	33.6 (31.1; 36.1)	<0.0001
Peso, z-score,	0.44 (0.25; 0.63)	0.09 (-0.12; 0.32)	0.87 (0.56; 1.18)	<0.0001
Altura, cm,	126 (125; 127)	124 (122; 125)	129 (126; 131)	<0.0001
Altura, z-score,	0.32 (0.17; 0.47)	0.15 (-0.05; 0.30)	0.54 (0.32; 0.75)	<0.001
IMC kg/m ² ,	18.1 (17.6; 18.7)	17.3 (16.6; 17.9)	19.5 (18.8; 20.3)	<0.0001
IMC, z.score,	0.34 (0.16; 0.53)	0.05 (-0.19; 0.29)	0.79 (0.56; 1.03)	<0.0001
Perímetro cintura, cm,	59.3 (57.8; 60.7)	57.9 (55.9; 59.8)	62.4 (60.3; 64.4)	<0.0001
PAS, mmHg,	103 (102; 105)	103 (101; 105)	105 (103; 108)	ns
PAD, mmHg,	58 (57; 59)	58 (56; 59)	59 (58; 61)	ns
Grasa corporal, %,	30.5 (29.2; 31.9)	28.5 (26.4; 30.5)	32.6 (30.8; 34.3)	<0.01
GIMc, cm,	0.041 (0.040; 0.042)	0.040 (0.038; 0.041)	0.043 (0.041; 0.045)	<0.001
Variables bioquímicas				
Glucosa, mg/dL,	86 (85;89)	86 (85; 87)	86 (85; 89)	ns
Insulina, μ UI/mL,	3.1 (2.6;-4,6)	2.8 (2.2; 3.5)	3.1 (2.5; 3.6)	<0.01
HOMA-IR,	0.7 (0.58; 0.82)	0.62 (0.48; 0.7)	1.03 (0.85; 1.25)	<0.01
Triglicéridos mg/dL,	57 (53; 61)	52 (48; 56)	67 (61; 74)	<0.0001
Colesterol HDL mg/dL,	58 (55; 59)	59 (57; 62)	54 (52; 57)	<0.01
PCRus, mg/L,	1.14 (0.94; 1.34)	0.90 (0.69; 1.10)	1.84 (1.44; 2.21)	<0.0001
OC total (ng/mL)	69.2 (64.7; 73.7)	77.8 (70.4; 85.3)	60.1 (56.9; 63.2)	<0.0001
OCdc (ng/mL)	34.8 (32.4; 37.1)	35.9 (32.6; 39.3)	31.2 (28.8; 33.5)	<0.01
Porcentaje de OCdc	52.3 (48.9; 55.7)	46.5 (44.2; 50.8)	51.9 (49.9; 57.6)	<0.01

Los resultados de las variables cuantitativas se expresan como media e intervalo de confianza del 95%.

MetS-: Descendientes de familias sin síndrome metabólico; MetS+: Descendientes de familias con síndrome metabólico; GIMc: Grosor íntima-media carotídea; IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina; HDL: Lipoproteína de alta densidad; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; OC: Osteocalcina; OCdc: Osteocalcina descarboxilada.

5.2.2 Asociación entre la osteocalcina y el grosor de la íntima media carotídea en la población general de niños sanos prepuberales

A continuación se ha analizado la asociación entre el GIMc y los diferentes parámetros clínicos y analíticos estudiados en nuestra cohorte de niños sanos prepuberales de la población general (Tabla 9).

Observamos que en la población general, el GIMc se asocia positivamente con el IMC, el perímetro de cintura, la grasa corporal, la insulina, HOMA-IR, la PCRus y negativamente con colesterol HDL y OC total (todos entre $p=0.01$ y $p<0.0001$).

RESULTADOS

Tabla 9 Coeficientes de correlación del GIMc con las variables seleccionadas para la población total de niños sanos prepuberales

GIMc, cm	Total (n=203)	
	r	p
Edad, años	0.187	0.01
IMC z-score	0.332	<0.0001
Perímetro cintura, cm	0.353	<0.0001
Grasa corporal %	0.202	0.009
PAS, mmHg	0.127	ns
PAD, mmHg	0.080	ns
PCRus, mg/dL	0.305	<0.0001
Triglicéridos mg/dL	0.116	ns
Colesterol HDL, mmol/L	-0.196	0.01
Insulina, μ UI/mL	0.223	0.004
HOMA-IR	0.229	0.003
OC total (ng/mL)	-0.222	0.004
OCdc (ng/mL)	-0.114	ns
Porcentaje de OCdc	0.120	ns

GIMc: Grosor íntima-media carotídea; IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina; HDL: Lipoproteína de alta densidad; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; OC: Osteocalcina; OCdc: Osteocalcina descarboxilada

Para estudiar si la asociación entre la OC y el GIMc es independiente de los marcadores de RCV (como el IMC y la PCRus) y otras variables de confusión, se ha realizado un modelo lineal multivariante con el GIMc como variable dependiente (Tabla 10).

Tabla 10 Modelo lineal multivariante del GIMc como variable dependiente en niños sanos prepuberales.

	GIMc		
	β	p	r ²
Población total (n=203)			
PCRus	0.299	<0.001	9.0%
IMC	0.389	<0.0001	15.1%
Porcentaje de OCdc	0.038	ns	--

Variables no predictoras: Edad, sexo, grasa corporal, triglicéridos, colesterol-HDL, OC total y OCdc. GIMc: Grosor íntima-media carotídea; IMC: Índice de masa corporal; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; OCdc: Osteocalcina descarboxilada

Una vez más observamos que para la población total de estudio, la PCRus y el IMC son variables predictoras del valor del GIMc explicando el 9% y 15.1% de su variación, respectivamente. La OC total, la OCdc y el porcentaje de OCdc no son variables predictoras del GIMc en la población total de niños sanos prepuberales.

5.2.3 Asociación entre la osteocalcina y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico

Se ha analizado la asociación entre el GIMc y los diferentes parámetros clínicos estudiados en subgrupos de la población según la presencia de antecedentes familiares de SM (Tabla 11).

Tabla 11 Coeficientes de correlación del GIMc con las variables seleccionadas en niños sanos prepuberales en subgrupos según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico

GIMc, cm	MetS- (n=104)		MetS+ (n=99)	
	r	p	r	p
Edad, años	0.003	ns	0.316	0.005
IMC z-score	0.258	0.014	0.329	0.003
Perímetro cintura, cm	0.243	0.021	0.373	0.001
Grasa corporal %	0.157	ns	0.175	ns
PAS, mmHg	0.138	ns	0.70	ns
PAD, mmHg	0.041	ns	0.149	ns
PCRus, mg/dL	0.400	<0.0001	0.287	0.01
Triglicéridos mg/dL	0.051	ns	0.026	ns
Colesterol HDL, mmol/L	-0.178	ns	-0.126	ns
Insulina, μ UI/mL	0.075	ns	0.286	0.01
HOMA-IR	0.089	ns	0.300	0.008
OC total (ng/mL)	-0.040	ns	-0.179	ns
OCdc (ng/mL)	-0.136	ns	0.281	0.005
Porcentaje de OCdc	-0.016	ns	0.449	<0.0001

Los resultados de las variables cuantitativas se expresan como media e intervalo de confianza del 95%. MetS-: Descendientes de familias sin síndrome metabólico; MetS+: Descendientes de familias con síndrome metabólico; GIMc: Grosor íntima-media carotídea; IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; HOMA-IR: Índice de resistencia a la insulina; HDL: Lipoproteína de alta densidad; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; OC: Osteocalcina; OCdc: Osteocalcina descarboxilada

Se observa que el GIMc se asocia significativamente con el IMC, el perímetro de cintura y la PCRus en los dos subgrupos de estudio ($p < 0.05$ a $p < 0.0001$).

RESULTADOS

En el grupo de niños MetS+ el GIMc se asocia también con la edad, la insulina, la HOMA-IR, la OCdc y especialmente el porcentaje de OCdc ($p < 0.05$ a $p < 0.0001$) (Tabla 11). Estas asociaciones no existen en niños con ausencia de antecedentes de SM (Tabla 11 y Figura 18).

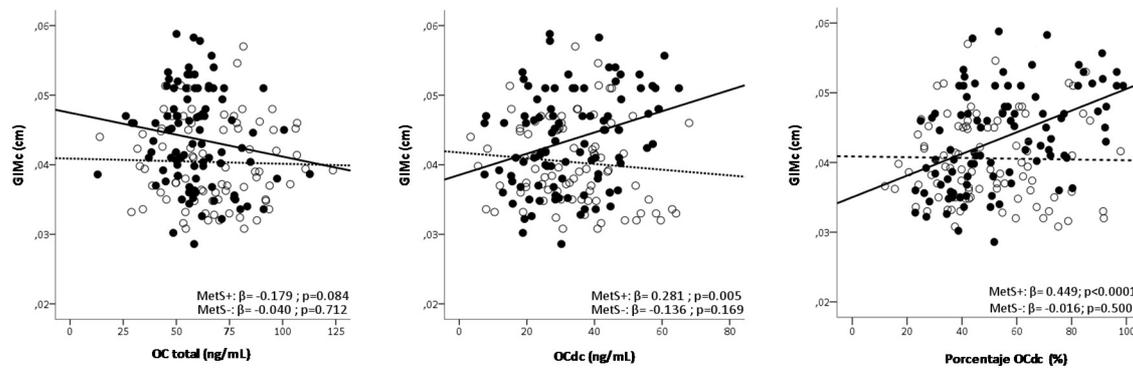


Figura 18. Correlación gráfica de la OC total, OCdc y porcentaje de OCdc con el GIMc. En las gráficas las líneas de regresión fueron significativamente diferentes para la asociación de OCdc y porcentaje de OCdc con el GIMc ($p < 0.05$). Los puntos negros y líneas de regresión continuas representan los niños con presencia de antecedentes de SM (MetS+). Los puntos blancos y líneas de regresión de puntos representan los niños con ausencia de antecedentes de SM (MetS-). Se muestran los valores de β y de p a partir del análisis de regresión.

Para estudiar el efecto del SM sobre la asociación entre el porcentaje de OCdc y el GIMc, se ha realizado un modelo lineal multivariante con el GIMc como variable dependiente teniendo en cuenta posibles variables confusoras (Tabla 12).

Tabla 12 Modelo lineal multivariante del GIMc como variable dependiente en niños sanos prepuberales en subgrupos según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico

	GIMc		
	β	p	r^2
MetS- (n=104)			
PCR	0.395	<0.0001	15.6%
Porcentaje de OCdc	-0.017	ns	--
MetS+ (n=99)			
IMC	0.270	0.01	12.2%
Porcentaje de OCdc	0.395	<0.0001	21.5%

Variables no predictoras: Edad, sexo, grasa corporal, triglicéridos, colesterol-HDL, OC total, OCdc. MetS-: Descendientes de familias sin síndrome metabólico; MetS+: Descendientes de familias con síndrome metabólico; GIMc: Grosor íntima-media carotídea; IMC: Índice de masa corporal; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; OCdc: Osteocalcina descarboxilada

El grupo MetS- la PCRus es la única variable predictora del GIMc explicando el 15.6% de su variabilidad. En el grupo MetS+, el porcentaje de OCdc y el IMC son variables predictoras del GIMc y explican el 21.5% y el 12.2% de la varianza del GIMc, respectivamente.

6 DISCUSIÓN

6.1 La proteína C reactiva y el riesgo cardiovascular

La evidencia científica sugiere que la ECV tiene su origen en edades tempranas de la vida y que el RCV está determinado por la suma de factores de riesgo que persisten en el tiempo produciendo en consecuencia una repercusión negativa sobre la calidad de vida ¹⁰¹. La arteriosclerosis es un proceso que comienza en la infancia, progresa a través de la adolescencia y la edad adulta pudiendo causar enfermedad coronaria en adultos jóvenes y mayores ^{218,219}.

Sabemos que en las últimas décadas, los trastornos nutricionales infantiles como el sobrepeso y la obesidad están en constante aumento a nivel mundial. Se estima que uno de cada dos niños obesos continúa siéndolo en etapas posteriores, con el consiguiente aumento del riesgo tres veces superior de padecer SM respecto a adultos obesos que no habían presentado problemas de peso en la niñez ²²⁰. La infancia es la etapa más importante para actuar en la prevención del RCV, pues en esta etapa se define la adiposidad. El número total de adipocitos está incrementado en obesos respecto a los niños con normopeso, de ahí que hasta el 75% de los niños obesos frente al 10% de los niños con normopeso desarrollan obesidad en etapas posteriores ²²¹. Además, recientemente se ha informado que la obesidad tiene efectos tempranos (en la primera década de la vida) sobre los niveles de PCRus ¹¹³.

Es bien sabido que el aumento del IMC se asocia con los marcadores de RCV más conocidos, como el aumento del perímetro de cintura, la grasa corporal, el aumento de la HOMA-IR, la presión arterial, el aumento del GIMc y los niveles de PCRus en sangre en niños y adolescentes ^{222,59}. En nuestro estudio aportamos nuevas evidencias al demostrar que la asociación entre la PCRus y el GIMc es independiente del IMC. Se podría explicar siguiendo el concepto de la capacidad de expansión del tejido adiposo, el equilibrio metabólico se mantiene siempre y cuando el depósito adiposo pueda guardar el suministro de calorías de manera segura, es decir, sin provocar un estado inflamatorio de bajo grado crónico ¹³⁷. En

consecuencia, las complicaciones vasculares de la obesidad pueden estar más relacionadas con la inflamación de bajo grado que lo que el exceso de grasa almacenada pueda provocar.

6.1.1 Asociación entre la proteína C reactiva y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales

EL GIMc es un marcador ya establecido de arteriosclerosis subclínica y un predictor de eventos vasculares ^{128,223}. Por otra parte, la PCRus es un biomarcador sensible de la inflamación cada vez más aceptado como un marcador de riesgo de arteriosclerosis. Wang C y col. (2003) observaron que la PCR tiene efectos proaterogénicos directos sobre las CMLV, aumentando la migración, proliferación y formación de neoíntima ¹¹¹.

Estudios realizados en poblaciones de adultos han demostrado que los niveles más altos de PCR en suero se han asociado con mayor GIMc ^{224,225}. Esta mayor concentración de PCR en sangre de manera persistente en el tiempo está fuertemente asociada con mayor riesgo vascular ^{106,226} y además se ha postulado que los niveles más altos de PCR podrían ser un marcador de desestabilización de placas arterioscleróticas ²²⁷. Estas afirmaciones destacan el papel directo de la PCR en la patogénesis de la arteriosclerosis ^{121,228}. Por lo tanto en adultos, la inflamación persistente puede reflejar cierta predisposición de las lesiones arterioscleróticas de pasar de ser subclínicas a enfermedad sintomática. Por otra parte, Reynolds y col. (1987) han constatado la presencia de la PCR en las paredes de las arterias afectadas y no se ha detectado en las paredes de los vasos sanos ²²⁹. Sin embargo hay menos experiencia con las formas preclínicas de enfermedad arteriosclerótica en niños.

En el presente estudio realizado sobre una muestra de 203 niños sanos prepuberales entre 7 y 8 años de edad, aportamos evidencias de las relaciones existentes entre la inflamación y la pared vascular, aquellos niños con mayores niveles de PCRus se asociaron significativamente con aumento del GIMc. Estudios previos realizados en niños sanos de 10 años de edad arrojaron conclusiones similares ¹³⁵. Los cambios estructurales muy sutiles en la pared de la arteria carótida pueden ser valorados con fiabilidad en los niños mediante la

medición del GIMc. Nuestros hallazgos complementan las observaciones de estudios anteriores al demostrar que la PCR_s sérica elevada se asocia a cambios estructurales de las arterias de niños sanos.

Estos cambios se pueden explicar en tres etapas de desarrollo de las lesiones ateroscleróticas por mediación inflamatoria (Figura 19). La primera etapa correspondería a un arteria con pared vascular normal, con la capa interna revestida por una monocapa de células endoteliales que está en contacto con la sangre, la capa íntima con células de músculo liso (CMLV) y la capa media con CMLV embebidas en una matriz extracelular. La segunda etapa correspondería con un aumento de la sobrecarga lipídica persistente, que produce la activación de la inflamación incluyendo la adhesión de la PCR circulante en la sangre a la monocapa endotelial. Esto desencadena una cascada de respuesta inflamatoria con la migración de células inflamatorias a la capa íntima, reclutación de macrófagos que fagocitan los lípidos, produciendo las llamadas células espumosas, núcleo de la placa de ateroma. Los procesos claves de la arteriosclerosis que ocurren en esta etapa son engrosamiento de la íntima y acumulación de lípidos. En la tercera etapa se observa la progresión de la lesión arteriosclerótica. Ante el daño vascular crónico, el endotelio se torna permeable y facilita la infiltración de células inflamatorias, PCR, lípidos y células espumosas desde la luz vascular hacia la íntima. La respuesta inflamatoria se perpetúa, produciendo el engrosamiento de las capas íntima y media debido a la ocupación de éstas capas por células inflamatorias, reactantes de fase aguda, hiperplasia de las CMLV, lípidos y detritus celulares. Los procesos claves de esta etapa son la presencia de PCR y células inflamatorias en la íntima, la persistente proliferación de CMLV y la formación de la placa de ateroma con contenido de lípidos y componentes inflamatorios. La arteriosclerosis puede permanecer estable y reducir la luz del vaso sin dar síntomas durante años.

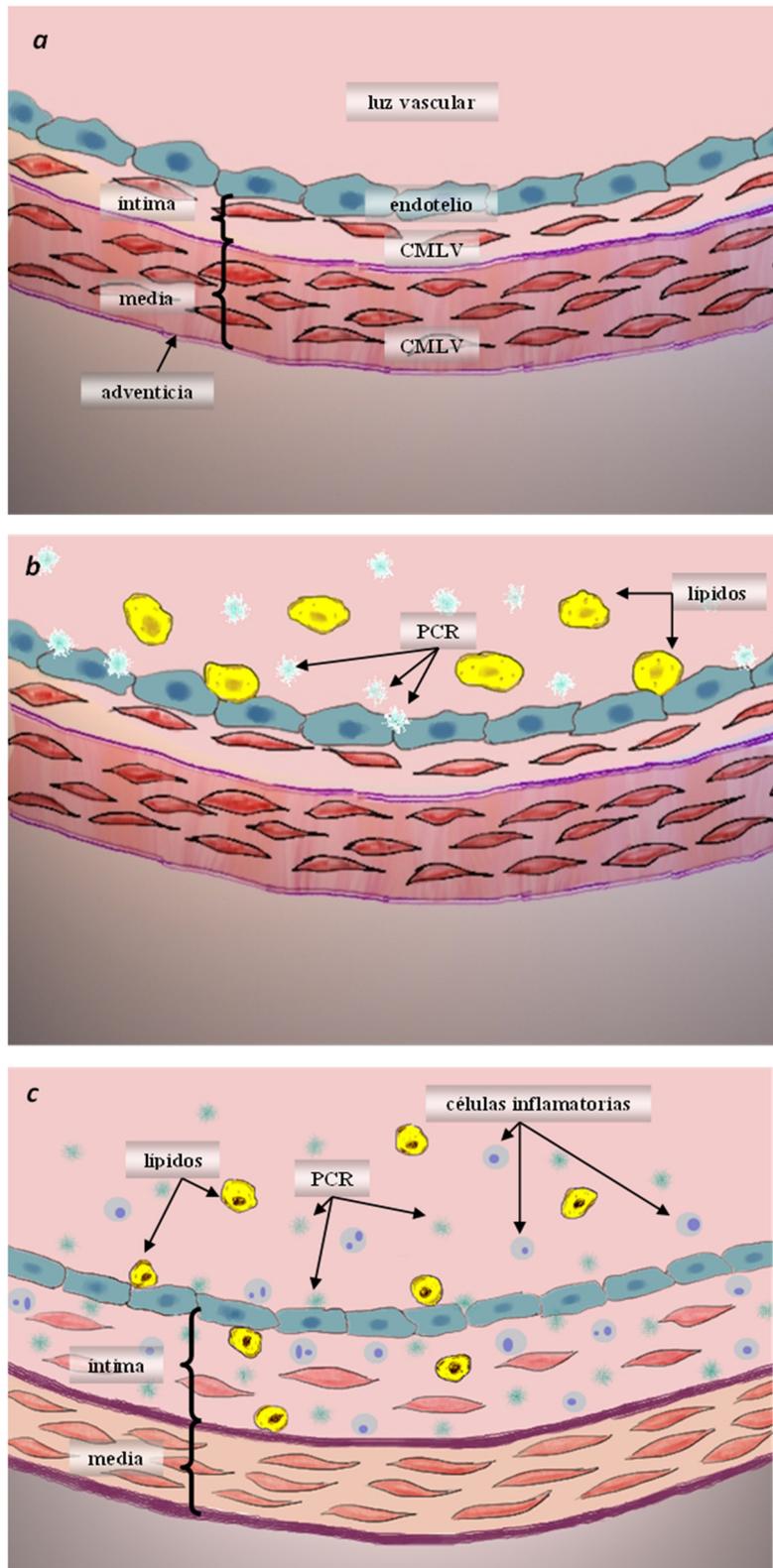


Figura 19. Modelo propuesto de asociación entre la proteína C reactiva (PCR) y el grosor de la íntima media carotídea (GIMC).

a) Estructura de la pared arterial normal. Intima: capa interna o la túnica íntima. CMLV: células musculares lisas vasculares; media: capa media o túnica media; adventicia: capa adventicia o capa exterior de las arterias. b) Los pasos iniciales de la aterosclerosis. c) La progresión de la lesión arteriosclerótica. (Imagen realizada por la autora).

6.1.2 Asociación entre la proteína C reactiva y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales según el grado de peso corporal

El grado de peso corporal se ha determinado mediante el valor del IMC. El valor del IMC se relaciona con la PCR y el GIMc. En nuestro estudio hemos querido estudiar si influye en la asociación de estas dos variables.

Respecto a la relación del IMC con la PCR, los estudios realizados en poblaciones de adultos han confirmado ampliamente las asociaciones independientes entre la PCRus y el IMC, así como su relación con el perímetro cintura-cadera y con la HOMA-IR ¹⁴⁴. Nuestros resultados han confirmados que los niveles séricos de PCRus se asocian con parámetros de obesidad en niños sanos prepuberales. Conclusiones similares han sido informadas por otros autores ^{114,116-118}. El mecanismo propuesto es que el tejido adiposo tiene capacidad para la activación de citoquinas como la IL-6, el principal regulador de la síntesis de la PCR por el hígado ^{144,230-232}. Concretamente se ha demostrado que la IL-6 es liberada a la circulación sistémica por el tejido adiposo ²³⁰, a su vez estas citoquinas median la RI en el músculo esquelético y en el tejido adiposo ²³¹. Por lo tanto, la asociación de la PCR con los índices de obesidad puede reflejar el papel de las citoquinas en la mediación de los efectos metabólicos de la obesidad, incluso en ausencia de un proceso inflamatorio agudo que implique la activación de los leucocitos.

La relación entre el IMC con el GIMc ha sido ampliamente estudiada en poblaciones de adultos. La evidencia científica ha demostrado que el IMC en la infancia se relaciona con el valor del GIMc en la edad adulta, pero a su vez esta asociación es independiente del IMC que se tenga de adulto ^{59,233}.

El valor normal del GIMc esta estandarizado en adultos, no es así en niños. Jourdan y col. (2005) han estudiado el GIMc de 247 niños caucásicos sanos y elaboraron unos percentiles de normalidad en función de la edad a partir de los 10 años. Observaron que el valor del GIMc aumentó ligeramente con la edad y este valor se vio sesgado en la pubertad por el aumento

del IMC ²⁵. En cambio Ishizu y col. (2004) estudiaron el GIMc de 60 niños sanos de 5 a 14 años de edad, elaboraron una ecuación para predecir este incremento con la edad expresado en mm: $0.009 \times \text{edad (años)} + 0.35$ ²³⁴. En el presente trabajo, el valor medio del GIMc fue de 0.041 cm, similar a los estudios previos. Böhm y col. (2009) realizaron un estudio en 267 niños de edades comprendidas entre 6 y 17 años. Observaron que el GIMc se relacionaba positivamente con la edad, el sexo, la TAS y el IMC; los varones tenían valores más elevados ²³⁵. En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas con el sexo, ni con la TAS. Estos resultados se pueden explicar por las características de la muestra estudiada: niños sanos de 7 años de edad, todos en estado prepuberal, a esta edad en condiciones normales no está presente el estímulo hormonal que acelera la velocidad de crecimiento y el desarrollo puberal con aumento de la masa grasa, el IMC y el GIMc ^{236,237}. Sin embargo observamos que los niños con más IMC tenían mayor GIMc resultados que coinciden con otros autores ^{25,235} y con el trabajo de Vercoza y col. (2009) que estudiaron el GIMc de 93 niños asintomáticos entre 4 y 14 años y observaron que los más obesos también presentaban valores superiores de GIMc ²³⁸. Esta diferencia de GIMc entre los grupos de estudio muestra una tendencia al incremento del mismo con la obesidad.

Teniendo en cuenta que la obesidad provoca un estado inflamatorio de bajo grado y que la PCRus se asoció positivamente con el GIMc en todos los grupos de IMC (valor Z del IMC ≤ 0 y valor Z del IMC > 0), nos hemos planteado si esta asociación se ve incrementada más precozmente por el valor del IMC o por las concentraciones de PCR en sangre. Nuestros datos indican que el aumento del GIMc se relaciona más con la inflamación persistente de bajo grado que con el IMC en los niños prepúberes sanos. De esta manera queda reforzado el concepto de que los marcadores inflamatorios, tales como PCR pueden jugar un papel preponderante y precoz en la patogénesis de la arteriosclerosis promoviendo el engrosamiento arterial, independientemente del valor del IMC. La exposición a factores de RCV en la infancia incrementa en 0.1 mm el GIMc en la etapa adulta, asociándose a un

incremento del RCV del 30%. Por tanto, consideramos que es de vital importancia la actuación preventiva a edades precoces sobre la futura arteriosclerosis en el adulto joven, pues la obesidad en la infancia predice el GIMc en adultos ²³⁹.

Aunque la exposición a factores de riesgo en la infancia puede contribuir al desarrollo de arteriosclerosis en el futuro, son necesarios estudios poblacionales más extensos y de seguimiento longitudinal para establecer una relación causal. Tomados en conjunto, nuestros hallazgos implican que la salud pública debe realizar estrategias dirigidas a la prevención precoz de ECV que incluyan las mediciones no invasivas de los cambios estructurales arteriales y la inflamación de bajo grado y no centrarse solamente en mediciones del IMC o de la adiposidad.

6.2 La osteocalcina y el riesgo cardiovascular

En poblaciones adultas, la relación entre la disminución de la masa ósea, fractura vertebral y mortalidad de origen cardiovascular está bien documentada ²⁴⁰. Además Farhat y col. (2007) agregaron que esta reducción de la masa ósea en pacientes con ECV era independiente de la edad ²⁴¹. También se ha descrito una asociación significativa entre una baja masa ósea y el infarto agudo de miocardio ²⁴², ictus ²⁴³ y arteriopatía periférica ²⁴⁴. Estudios recientes han vinculado la OC con el RCV al relacionarla con las placas de arteriosclerosis ¹⁸⁵ y con el metabolismo energético ¹⁶³.

Ante la necesidad de comprender las vías metabólicas que producen el SM y su relación con la arteriosclerosis, se han buscado nuevos marcadores del RCV hasta ahora menos conocidos para intentar explicar una de las vías utilizadas. En los últimos tiempos, se ha avanzado en el estudio de la OC como nuevo marcador de RCV en pacientes con SM.

Informes clínicos recientes sobre poblaciones de adultos han documentado asociaciones significativas entre los niveles circulantes de OC total y componentes del SM como el IMC, el perímetro de cintura y la RI ^{178-180,198,245}. Lee y col. (2007) observaron que los

ratones que carecen de OC tienen mayor cantidad de grasa visceral, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en comparación con ratones salvajes; al inyectarles OC disminuyó la grasa visceral y mejoraron la tolerancia a la glucosa y los niveles de insulina en sangre ¹⁶³.

Nuestro estudio ha demostrado las asociaciones clínicas entre las diferentes formas de OC (total y descarboxilada) con parámetros metabólicos en niños sanos. La presencia de antecedentes familiares de SM influye en los nuevos marcadores de RCV de sus hijos. Asimismo, confirmamos la hipótesis de que la OCdc y no la OC total, se asocia a un perfil cardiovascular desfavorable en los hijos de padres con antecedentes de SM.

A pesar de que la mayoría de estos estudios no discriminan entre las formas de OCdc y la OC total, las asociaciones se asumieron siguiendo el supuesto papel de la OCdc en la regulación del metabolismo energético ¹⁵⁷ y en la calcificación de la pared vascular ¹⁷⁵. Nuestros resultados apoyan estos hallazgos y los experimentados en modelos animales ^{162,163}. La concentración sérica de OC total fue más baja en el grupo de niños con padres con SM, sin embargo el porcentaje de OCdc fue mayor en los hijos de familias MetS+; este aumento posiblemente está relacionado con la participación de la OCdc en la regulación de la secreción de insulina.

En un trabajo reciente, se ha observado que un aumento de la proporción relativa de OCdc puede contribuir a la mejora de la secreción de insulina en sujetos más delgados y compensar el déficit de adiponectina, hormona que también participa en la regulación del metabolismo energético y es deficitaria en sujetos obesos ¹⁷². Mientras que hasta aquí se ha sugerido a la OC como protectora de la ECV ^{178,202,203}, otros investigadores han encontrado que el aumento de la forma OCdc en suero está asociada con la calcificación de la arteria carótida en sujetos con hipertensión ¹⁷⁶ y SM ²⁰⁷. Sin embargo en el trabajo presentado por Prats-Puig y col. (2009) observaron que la proporción relativa de OCdc pero no la OC total estaba relacionada de manera diferente con parámetros endócrinos y esta asociación era dependiente del peso corporal en niños prepuberales sanos ¹⁷². Por lo tanto, no podemos

excluir la posibilidad de que los efectos metabólicos y vasculares de la OCdc pueden estar disociados. Si bien hemos encontrado una menor concentración de OC total y OCdc en el grupo de familias MetS+ es de destacar que tanto la OCdc y especialmente el porcentaje de OCdc se relacionó positivamente con el grupo de niños con más RCV. Nuestros resultados aportan evidencias de que el porcentaje de OCdc puede ser un nuevo marcador de RCV subclínico presente en niños con historia familiar de SM.

6.2.1 Asociación de la osteocalcina y el grosor de íntima media carotídea en niños sanos prepuberales

La influencia de marcadores óseos en la patogenia de la ECV se ha puesto de manifiesto a través de estudios en modelos animales. Ratones *knockout* para la OC sufren una intensa calcificación vascular por lo que se ha atribuido a esta proteína un efecto inhibitor de la calcificación arterial ¹⁸⁷

En nuestro estudio hemos observado que los niveles séricos de OC total se relacionan negativamente con el valor del GIMc en niños sanos prepuberales, mientras que la forma descarboxilada de OC no presentó asociación en este grupo de niños. Kanazawa y col. (2009) en un estudio realizado sobre pacientes con DM 2 de raza asiática afirmaba que el aumento de la OC total en suero se asociaba negativamente con la velocidad de onda de pulso braquial-tobillo y el GIMc, en consecuencia disminuía el riesgo de ECV ¹⁷⁸.

Además, pacientes adultos con ateromatosis carotídea y calcificación aórtica presentaron menores concentraciones de OC en sangre respecto a los controles sanos ¹⁸⁹. Zhang y col. (2010) afirman en su trabajo que las concentraciones bajas de OC sérica se asociaron a un menor riesgo de cardiopatía isquémica ²⁰².

Sin embargo, otros autores que también estudiaron la relación entre los niveles séricos de OC y las ECV han obtenido resultados controvertidos ^{176,178,202,204}. En un estudio realizado sobre modelos animales con enfermedad arterial periférica, concluyeron que la intensidad de ésta se relaciona con el número de células mononucleares con inmunorreactividad para

la OC ¹⁸⁸, por lo que podría estar relacionada con el grado de afectación vascular. Siguiendo esta misma línea, Idelevich y col. (2011) describían el posible mecanismo de asociación de la OC con el GIMc, observaron que la OC mediaba la diferenciación osteocondrogénica de las CMLV a través de la regulación positiva del factor 1- α inducible por hipoxia ¹⁷³. Las CMLV activadas migraban desde la capa media arterial hacia el lumen del vaso donde proliferaban, promovían la hiperplasia de la íntima y la síntesis de citoquinas; además la OC aceleraba la mineralización vascular ^{173,246,247}. Varios autores más tarde apoyaron éstos hallazgos ^{202,203}. En trabajos más recientes realizados en adultos, se observaron que los niveles séricos más elevados de OC total se asociaron con una mayor prevalencia de arteriosclerosis carotídea en mujeres posmenopáusicas ²⁰⁴ y en pacientes con DM 2 ^{205,206}.

Sin embargo, estos resultados contradictorios entre los diferentes autores sobre el papel de la OC en el desarrollo de la arteriosclerosis, pueden explicarse en parte por diferencias en las características de los individuos estudiados, por la presencia de otras variables confusoras como factores raciales, adiposidad y enfermedad de base en algunos casos.

Aunque en el momento actual no se conoce si la OC producida por los osteoblastos ejerce o no un papel modulador sobre la pared arterial y desarrollo de arterioesclerosis, futuros estudios deben confirmar el valor de la determinación de la OC en el diagnóstico preclínico y en el seguimiento de la patología vascular, ya que los datos iniciales son prometedores.

6.2.2 Asociación entre la osteocalcina y el grosor de la íntima media carotídea en niños sanos prepuberales según la presencia de antecedentes familiares de síndrome metabólico

Sabemos que el SM es un conglomerado de alteraciones del metabolismo relacionadas con el RCV, incluyendo la obesidad, los trastornos en el metabolismo de lípidos y de la glucemia en ayunas. Las personas diagnosticadas de SM tienen un riesgo 2 veces mayor de

padecer ECV ²⁰¹. Además se ha demostrado que los padres con SM transmiten el RCV a sus hijos exponiéndolos a desarrollar la ECV de forma precoz. ^{79,80}

En nuestro trabajo observamos que en el grupo de niños con antecedentes familiares de SM (MetS+) el GIMc se asoció de manera significativa con el aumento de la OCdc, especialmente el porcentaje de OCdc, en cambio no hubo asociación con la OC total. También se asoció positivamente con marcadores de RCV clásicos como el IMC, el perímetro cintura, la HOMA-IR y la PCRus. En cambio al analizar el grupo de niños sin antecedentes de SM, el GIMc no mostró asociación con la OC total, ni con las formas de OCdc.

Resultados similares presentaron en el trabajo realizado en niños prepuberales no diabéticos por Prats y col. (2010) donde encontraron que el aumento de relación OCdc/OCc se asociaba a niveles más altos de HOMA-IR ¹⁷². Otros autores han asociado a la OCdc con el aumento del GIMc y la calcificación de la carótida en pacientes con hipertensión arterial y con SM ^{176,207}

Estos hallazgos pueden interpretarse porque la OCdc es la forma de OC con actividad hormonal al relacionarse con el metabolismo de la glucosa a través de las células β del páncreas y la HOMA-IR, mecanismo hasta ahora más estudiado. Sin embargo no existe suficiente experiencia descrita sobre los posibles efectos de la OCdc en los cambios estructurales de la pared vascular. Posiblemente se deba a que la fracción descarboxilada es la forma libre y circula en sangre periférica, por lo que ante situaciones que produzcan trastornos del metabolismo energético como el SM, lleva al aumento la relación OCdc/OCc elevando sus concentraciones en sangre, incrementando en consecuencia su actividad endócrina sobre el metabolismo lipídico y glucídico y la producción de cambios estructurales de la pared muscular al activar la proliferación y la migración de las CMLV hacia el lumen del vaso, activación de citoquinas inflamatorias, hiperplasia de la íntima vascular y mineralización de la pared vascular.

Los resultados sugieren que la presencia de antecedentes familiares de SM modifica la relación de la OCdc/Occ y su asociación con el GIMc. En nuestro trabajo ha quedado demostrado que niños sanos con antecedentes familiares de SM tienen aumento de la OCdc en sangre, siendo la forma descarboxilada de OC en suero y no la OC total la que puede servir como una fuente de OC para la calcificación de la pared vascular y en consecuencia aumenta el valor del GIMc ¹⁷⁵. Con lo cual se sugiere que el aumento del nivel de OCdc circulante puede postularse como un nuevo marcador pre-clínico de calcificación de la arteria carótida al encontrarse elevada en los niños sanos que tienen antecedentes familiares de SM. Resultados similares apoyan esta hipótesis en sujetos adultos con hipertensión arterial ¹⁷⁶.

Consideramos que son necesarios no obstante, más estudios para aclarar si esta asociación diferencial de la OCdc con marcadores metabólicos y con el GIMc, es un intermediario y/o un efector en el desarrollo de la arteriosclerosis desde etapas muy tempranas, antes de evidenciar la calcificación de la pared vascular.

El mecanismo propuesto de la actividad de la OCdc sobre la pared vascular en niños sanos prepuberales con antecedentes familiares de SM se podría explicar por un aumento de reactantes de fase aguda y de la OCdc circulante, produciendo hiperplasia y migración de las CMLV hacia la íntima. El endotelio permeable por la liberación de citoquinas permite el paso de OCdc y lípidos desde el lumen vascular hacia la íntima, produciendo aumento del GIM y la mineralización de la pared vascular (Figura 20).

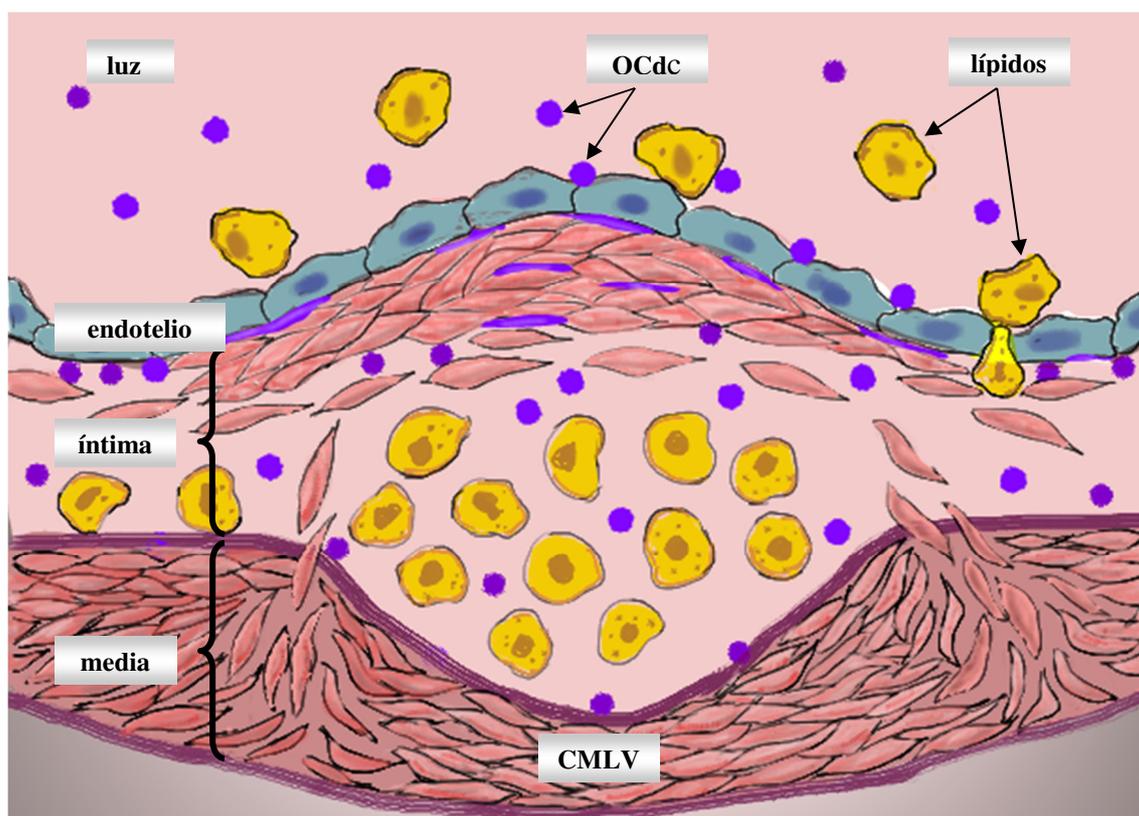


Figura 20. Modelo propuesto de asociación entre la osteocalcina descarboxilada y el grosor de la íntima media carotídea en pacientes con antecedentes de SM. OCdc: Osteocalcina descarboxilada, CMLV: Células musculares lisas vasculares. (Imagen realizada por la autora).

6.3 Discusión conjunta de los resultados

En resumen, la arteriosclerosis comienza en edades muy tempranas. Su detección en etapas preclínicas es de gran interés. El estudio de los cambios estructurales de la arteria carótida se puede realizar a través del GIMc, marcador precoz de arteriosclerosis. El aumento del GIMc está determinado por la presencia de un proceso inflamatorio persistente de bajo grado que es independiente del IMC. La determinación de la PCRus se asoció positivamente con el GIMc y esta asociación fue más potente que la asociación con el IMC. En la figura 21 mostramos el mecanismo propuesto que explicaría la asociación entre la PCR y el GIMc tanto para la población general como en los subgrupos del valor Z del IMC $>$ y ≤ 0 . El tejido adiposo estimula la síntesis y liberación de la PCR a través del hígado. El aumento persistente de PCR en sangre produce cambios estructurales de la pared vascular aumentando el GIMc y desarrollo de arteriosclerosis.

Por otro lado, el metabolismo óseo a través de la OC en su forma descarboxilada interviene en el metabolismo energético y los pacientes con SM tienen alterada esta relación. En las cohortes estudiadas, los niños sanos con antecedentes familiares de SM, además de asociarse positivamente con marcadores de RCV conocidos como la PCRus, el IMC y el GIMc, tienen aumentado los niveles en sangre de OCdc y el porcentaje de OCdc. Por último, observamos que el porcentaje de OCdc se asoció de manera significativa con el GIMc en el grupo de niños con antecedentes familiares de SM. Nuestros resultados sugieren que es la forma descarboxilada de la OC la que podría ejercer efectos nocivos en la pared vascular de los niños prepúberes sanos con antecedentes familiares con SM. También mostramos el mecanismo propuesto que explica la relación entre la OCdc y el GIMc en niños con antecedentes familiares de SM en la figura 21. En los niños con antecedentes de SM aumenta la proporción de OCdc en sangre. Se ha demostrado que la OCdc tiene actividad sobre el metabolismo energético, estimulando las células β del páncreas y la síntesis de citoquinas en el tejido adiposo e hígado. Esto provocaría un aumento de citoquinas inflamatorias que producirían cambios estructurales en la pared vascular: aumento del GIMc y mineralización de la misma. Por otro lado, se ha descrito la presencia de OCdc en la pared vascular, sugiriendo que la OCdc puede actuar directamente sobre la pared vascular y producir los cambios estructurales arterioscleróticos.

Hemos visto hasta ahora que el GIMc es un potente predictor de eventos cardiovasculares adversos ⁹⁵, que los pacientes con SM tienen un mayor riesgo de desarrollar ECV ^{61,63}, que la concentración de factores de riesgo metabólicos en edades tempranas de la vida puede conferir un mayor riesgo de ECV en la edad adulta ^{82,248,249} mediante la inducción de cambios estructurales y funcionales en el sistema circulatorio ¹⁹⁰, aumentando el estrés oxidativo ^{35,250}, y/o acelerando la aterogénesis ^{123,251,252}.

Reconocemos las limitaciones de nuestro estudio. El diseño transversal no puede probar una relación de causalidad entre la PCRus, la OCdc y la progresión de la ECV. Se

requiere una extensión longitudinal de nuestro estudio con el fin de inferir, por ejemplo, si los niños sanos que tienen mayores niveles en sangre de PCRus o de OCdc antes de la pubertad tienden a desarrollar un fenotipo cardiovascular más adverso con el tiempo. Sin embargo, hasta ahora este es el único ensayo con una muestra importante realizado en niños sanos prepuberales que aporta evidencias sobre la presencia de nuevos marcadores de RCV en etapa subclínica.

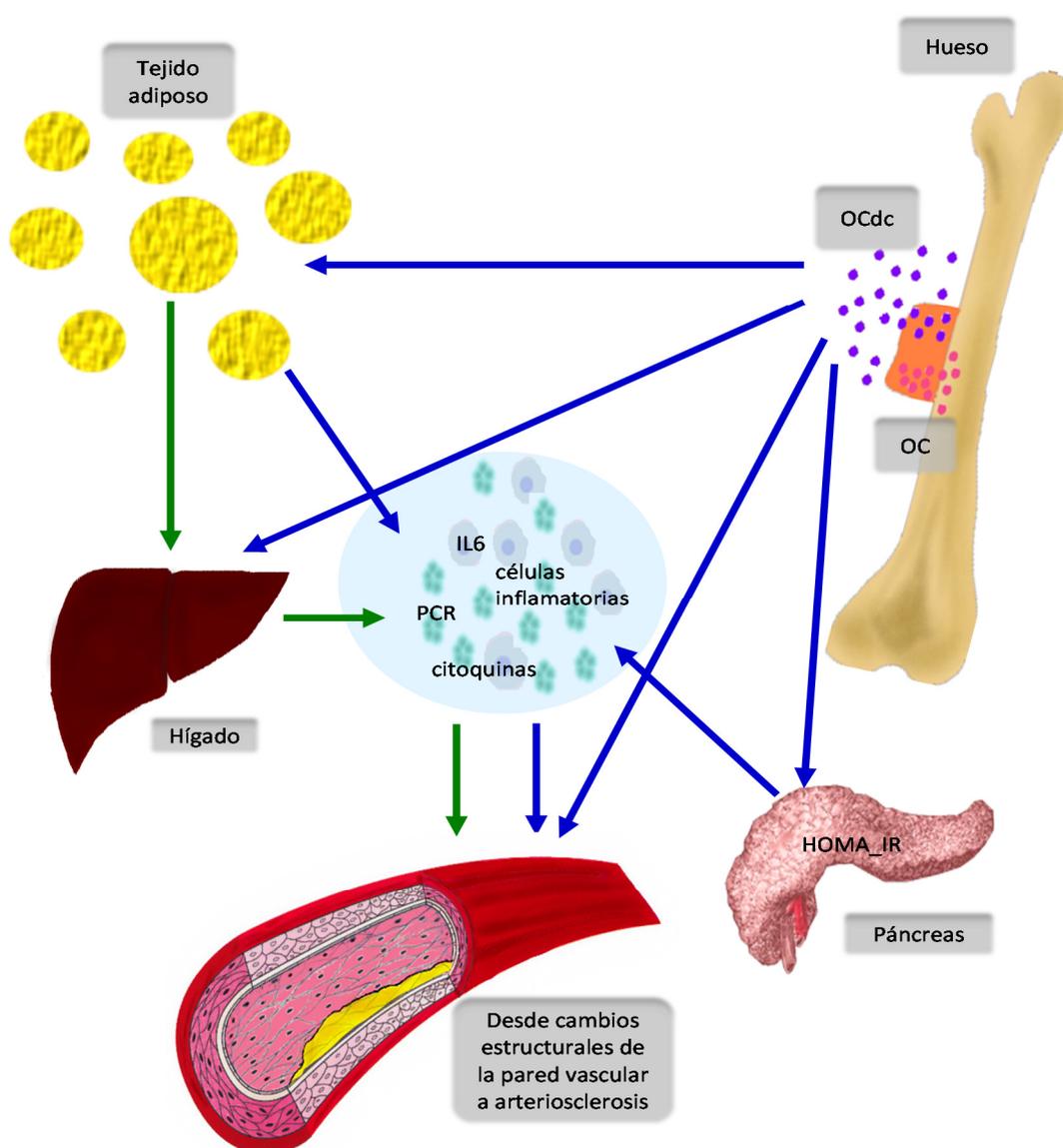


Figura 21. Modelo propuesto de asociación entre la PCR, la OCdc y el GIMc. Las flechas verdes ilustran el mecanismo propuesto que explica la asociación entre la PCR y el GIMc tanto para la población general como en los subgrupos del valor Z del IMC $>$ y \leq 0. Las flechas azules ilustran el mecanismo propuesto que explica la relación entre la OCdc y el GIMc en niños con antecedentes familiares de SM. (Imagen realizada por la autora).

7 CONCLUSIONES

1. Las concentraciones séricas de la PCR se asocian a un perfil metabólico y vascular desfavorable y presenta asociaciones positivas con el GIMc en niños prepuberales sanos.
2. El grado de peso corporal no modifica la asociación entre la PCR y el GIMc. La PCR es un marcador de arteriosclerosis preclínica en la edad pediátrica independiente del grado de peso corporal.
3. El porcentaje de OCdc se asocia a un perfil vascular desfavorable y presenta asociaciones positivas con el GIMc en niños prepuberales sanos.
4. La presencia de antecedentes familiares de SM modifica la asociación entre el porcentaje de OCdc y el GIMc. El porcentaje de OCdc es un marcador de arteriosclerosis preclínica en niños prepuberales que presentan antecedentes familiares de SM.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Dawber TR, Kannel WB, Revotskie N, Kagan A. The epidemiology of coronary heart disease--the Framingham enquiry. *Proc R Soc Med*. Apr 1962;55:265-271.
2. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med*. Jun 1998;338(23):1650-1656.
3. Meyer AA, Kundt G, Lenschow U, Schuff-Werner P, Kienast W. Improvement of early vascular changes and cardiovascular risk factors in obese children after a six-month exercise program. *J Am Coll Cardiol*. Nov 2006;48(9):1865-1870.
4. Webber LS, Voors AW, Srinivasan SR, Frerichs RR, Berenson GS. Occurrence in children of multiple risk factors for coronary artery disease: the Bogalusa heart study. *Prev Med*. May 1979;8(3):407-418.
5. Skilton MR, Celermajer DS. Endothelial dysfunction and arterial abnormalities in childhood obesity. *Int J Obes (Lond)*. Jul 2006;30(7):1041-1049.
6. Organization WH. Global status report on noncommunicable diseases 2010; 2011.
7. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. Nov 2006;3(11):e442.
8. Dawber TR, Meadors GF, Moore FE, Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health*. Mar 1951;41(3):279-281.
9. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. May 1998;97(18):1837-1847.
10. Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, et al. [Coronary risk estimation in Spain using a calibrated Framingham function]. *Rev Esp Cardiol*. Mar 2003;56(3):253-261.
11. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Molecular biology of sperm head shaping. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007;65:33-43.
12. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 4:S1-14.
13. Clark JM, Glagov S. Structural integration of the arterial wall. I. Relationships and attachments of medial smooth muscle cells in normally distended and hyperdistended aortas. *Lab Invest*. May 1979;40(5):587-602.
14. Schmidt-Trucksass A, Grathwohl D, Schmid A, et al. Structural, functional, and hemodynamic changes of the common carotid artery with age in male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Apr 1999;19(4):1091-1097.
15. Pignoli P. Ultrasonud B-Mode imaging for arterial wall thickness measurement. *Atherosclerosis Rev*. 1984;12:177-184.
16. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*. Dec 1986;74(6):1399-1406.
17. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis*. 2007;23(1):75-80.
18. Pignoli P, Longo T. Ultrasound evaluation of atherosclerosis. Methodological problems and technological developments. *Eur Surg Res*. 1986;18(3-4):238-253.
19. Persson J, Formgren J, Israelsson B, Berglund G. Ultrasound-determined intima-media thickness and atherosclerosis. Direct and indirect validation. *Arterioscler Thromb*. Feb 1994;14(2):261-264.

20. Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age: The Muscatine Study. *Circulation*. Dec 2001;104(23):2815-2819.
21. Furberg CD, Byington RP, Craven TE. Lessons learned from clinical trials with ultrasound end-points. *J Intern Med*. Nov 1994;236(5):575-580.
22. Berglund GL. Ultrasound in clinical trials of atherosclerosis. Introduction. *J Intern Med*. Nov 1994;236(5):551-553.
23. Kanters SD, Algra A, van Leeuwen MS, Banga JD. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements: a review. *Stroke*. Mar 1997;28(3):665-671.
24. de Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, et al. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation*. Jun 2004;109(23 Suppl 1):III33-38.
25. Jourdan C, Wuhl E, Litwin M, et al. Normative values for intima-media thickness and distensibility of large arteries in healthy adolescents. *J Hypertens*. Sep 2005;23(9):1707-1715.
26. Sass C, Herbeth B, Chapet O, Siest G, Visvikis S, Zannad F. Intima-media thickness and diameter of carotid and femoral arteries in children, adolescents and adults from the Stanislas cohort: effect of age, sex, anthropometry and blood pressure. *J Hypertens*. Nov 1998;16(11):1593-1602.
27. Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Increased common carotid intima-media thickness. Adaptive response or a reflection of atherosclerosis? Findings from the Rotterdam Study. *Stroke*. Dec 1997;28(12):2442-2447.
28. Vaudo G, Schillaci G, Evangelista F, Pasqualini L, Verdecchia P, Mannarino E. Arterial wall thickening at different sites and its association with left ventricular hypertrophy in newly diagnosed essential hypertension. *Am J Hypertens*. Apr 2000;13(4 Pt 1):324-331.
29. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. Feb 2008;21(2):93-111; quiz 189-190.
30. Roman MJ, Naqvi TZ, Gardin JM, Gerhard-Herman M, Jaff M, Mohler E. Clinical application of noninvasive vascular ultrasound in cardiovascular risk stratification: a report from the American Society of Echocardiography and the Society of Vascular Medicine and Biology. *J Am Soc Echocardiogr*. Aug 2006;19(8):943-954.
31. Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP, et al. Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III. *Circulation*. Jan 2000;101(1):E16-22.
32. Taylor AJ, Merz CN, Udelson JE. 34th Bethesda Conference: Executive summary--can atherosclerosis imaging techniques improve the detection of patients at risk for ischemic heart disease? *J Am Coll Cardiol*. Jun 2003;41(11):1860-1862.
33. Young W, Gofman JW, Tandy R, Malamud N, Waters ES. The quantitation of atherosclerosis. II. Quantitative aspects of the relationship of blood pressure and atherosclerosis. *Am J Cardiol*. Aug 1960;6:294-299.
34. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol*. Sep 1997;146(6):483-494.
35. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. Jan 1999;340(1):14-22.

36. Simon A, Garipey J, Chironi G, Megnien JL, Levenson J. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *J Hypertens*. Feb 2002;20(2):159-169.
37. Bond MG, Adams MR, Bullock BC. Complicating factors in evaluating coronary artery atherosclerosis. *Artery*. 1981;9(1):21-29.
38. Zarias C, Zatina M, Glagov S. *Correlation of postmortem angiography with pathologic anatomy: quantitation of atherosclerotic lesions*. In Bond MG, Insull W, Glagov S, Chandler AB, Cornhill JF, editors: *Clinical diagnosis of atherosclerosis: quantitative methods of evaluation*. New York; 1983.
39. Wissler R. *Principles of the pathogenesis of atherosclerosis*. Vol 5. Philadelphia; 1984.
40. Schmermund A, Baumgart D, Gorge G, et al. Measuring the effect of risk factors on coronary atherosclerosis: coronary calcium score versus angiographic disease severity. *J Am Coll Cardiol*. May 1998;31(6):1267-1273.
41. Bras i Marquillas J. Obesidad en la infancia y adolescencia. *Revista pediatría de Atención Primaria*. 2005;VII(26):33-54.
42. Niswender KD, Beech BM. Obesity: increasing awareness of novel environmental factors. *Diabetes*. Jul 2008;57(7):1786-1787.
43. Campillo Álvarez J. Las perspectivas evolucionistas de la obesidad. *Rev Esp Obes*. 2004;3(139-151).
44. Organisation WH. Global strategy on diet, physical activity and health. Childhood overweight and obesity. In: Geneve. Pap, ed; 2011.
45. Organisation WH. Obesity and overweight. In: centre M, ed; 2004.
46. Perez-Farinos N, Lopez-Sobaler AM, Dal Re MA, et al. The ALADINO study: a national study of prevalence of overweight and obesity in Spanish children in 2011. *Biomed Res Int*. 2013:163687.
47. Sabin MA, Holly JM, Shield JP, et al. Mature subcutaneous and visceral adipocyte concentrations of adiponectin are highly correlated in prepubertal children and inversely related to body mass index standard deviation score. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan 2006;91(1):332-335.
48. de la Puente ML, Canela J, Alvarez J, Salleras L, Vicens-Calvet E. Cross-sectional growth study of the child and adolescent population of Catalonia (Spain). *Ann Hum Biol*. Sep-Oct 1997;24(5):435-452.
49. Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Ribas Barba L, Serra Majem L. Epidemiología y factores determinantes de la obesidad infantil y juvenil en España. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2005;7(1):13-20.
50. Reis JP, Loria CM, Lewis CE, et al. Association between duration of overall and abdominal obesity beginning in young adulthood and coronary artery calcification in middle age. *Jama*. Jul 2013;310(3):280-288.
51. Bose S, Krishnamoorthy P, Varanasi A, et al. Measurement of waist circumference predicts coronary atherosclerosis beyond plasma adipokines. *Obesity (Silver Spring)*. Jan 2013;21(1):E118-123.
52. Lewandowski A, Dluzniewski M, Chmielewski M, et al. Evaluation of the relations between the presence of the metabolic syndrome and the degree of visceral obesity and the severity of coronary artery disease by coronary angiography. *Kardiol Pol*. 2013;71(9):937-944.
53. Ciccone MM, Miniello V, Marchioli R, et al. Morphological and functional vascular changes induced by childhood obesity. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. Dec 2011;18(6):831-835.
54. Reinehr T, Kiess W, de Sousa G, Stoffel-Wagner B, Wunsch R. Intima media thickness in childhood obesity: relations to inflammatory marker, glucose metabolism, and blood pressure. *Metabolism*. Jan 2006;55(1):113-118.

55. Reinehr T, Wunsch R. Intima media thickness-related risk factors in childhood obesity. *Int J Pediatr Obes*. Sep 2011;6 Suppl 1:46-52.
56. Fang J, Zhang JP, Luo CX, Yu XM, Lv LQ. Carotid Intima-media thickness in childhood and adolescent obesity relations to abdominal obesity, high triglyceride level and insulin resistance. *Int J Med Sci*. Aug 2010;7(5):278-283.
57. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. Jan 2007;115(4):459-467.
58. Iannuzzi A, Licenziati MR, Acampora C, et al. Increased carotid intima-media thickness and stiffness in obese children. *Diabetes Care*. Oct 2004;27(10):2506-2508.
59. Freedman DS, Patel DA, Srinivasan SR, et al. The contribution of childhood obesity to adult carotid intima-media thickness: the Bogalusa Heart Study. *Int J Obes (Lond)*. May 2008;32(5):749-756.
60. The recognition and management of hyperlipidaemia in adults: A policy statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. May 1988;9(5):571-600.
61. Day C. Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res*. Mar 2007;4(1):32-38.
62. Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. Jan 2004;109(1):42-46.
63. Najarian RM, Sullivan LM, Kannel WB, Wilson PW, D'Agostino RB, Wolf PA. Metabolic syndrome compared with type 2 diabetes mellitus as a risk factor for stroke: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med*. Jan 2006;166(1):106-111.
64. Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. Jan 2010;375(9710):181-183.
65. Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA. Are obesity-related metabolic risk factors modulated by the degree of insulin resistance in adolescents? *Diabetes Care*. Jul 2006;29(7):1599-1604.
66. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*. May 1998;47(5):699-713.
67. Groop L. Genetics of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. Mar 2000;83 Suppl 1:S39-48.
68. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet*. Sep 2005;366(9491):1121-1131.
69. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama*. Dec 2002;288(21):2709-2716.
70. Weiss R, Dziura J, Burgert TS, et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med*. Jun 2004;350(23):2362-2374.
71. Federation ID. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.; Novembre 25, 2012.
72. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. Jul 1998;15(7):539-553.
73. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. May 2001;285(19):2486-2497.
74. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes*. Oct 2007;8(5):299-306.
75. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab*. Nov 2002;28(5):364-376.

76. Valle M, Gascon F, Martos R, et al. Metabolic cardiovascular syndrome in obese prepubertal children: the role of high fasting insulin levels. *Metabolism*. Apr 2002;51(4):423-428.
77. Vanhala M, Vanhala P, Kumpusalo E, Halonen P, Takala J. Relation between obesity from childhood to adulthood and the metabolic syndrome: population based study. *Bmj*. Aug 1998;317(7154):319.
78. Snyder EE, Walts B, Perusse L, et al. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res*. Mar 2004;12(3):369-439.
79. Maumus S, Marie B, Siest G, Visvikis-Siest S. A prospective study on the prevalence of metabolic syndrome among healthy french families: two cardiovascular risk factors (HDL cholesterol and tumor necrosis factor-alpha) are revealed in the offspring of parents with metabolic syndrome. *Diabetes Care*. Mar 2005;28(3):675-682.
80. Pankow JS, Jacobs DR, Jr., Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. Insulin resistance and cardiovascular disease risk factors in children of parents with the insulin resistance (metabolic) syndrome. *Diabetes Care*. Mar 2004;27(3):775-780.
81. Zhou L, Chen Y, Sun N, Liu X. Family history of hypertension and arterial elasticity characteristics in healthy young people. *Hypertens Res*. May 2008;31(5):833-839.
82. Raitakari OT, Juonala M, Kahonen M, et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Jama*. Nov 5 2003;290(17):2277-2283.
83. Ford ES, Li C. Defining the metabolic syndrome in children and adolescents: will the real definition please stand up? *J Pediatr*. Feb 2008;152(2):160-164.
84. Chi CH, Wang Y, Wilson DM, Robinson TN. Definition of metabolic syndrome in preadolescent girls. *J Pediatr*. Jun 2006;148(6):788-792.
85. Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med*. Aug 2003;157(8):821-827.
86. Dhuper S, Cohen HW, Daniel J, et al. Utility of the modified ATP III defined metabolic syndrome and severe obesity as predictors of insulin resistance in overweight children and adolescents: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:4.
87. Sen Y, Kandemir N, Alikasifoglu A, Gonc N, Ozon A. Prevalence and risk factors of metabolic syndrome in obese children and adolescents: the role of the severity of obesity. *Eur J Pediatr*. Oct 2008;167(10):1183-1189.
88. Lopez-Capape M, Alonso M, Colino E, Mustieles C, Corbaton J, Barrio R. Frequency of the metabolic syndrome in obese Spanish pediatric population. *Eur J Endocrinol*. Aug 2006;155(2):313-319.
89. Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet*. Aug 2002;360(9331):473-482.
90. Morrison JA, Friedman LA, Gray-McGuire C. Metabolic syndrome in childhood predicts adult cardiovascular disease 25 years later: the Princeton Lipid Research Clinics Follow-up Study. *Pediatrics*. Aug 2007;120(2):340-345.
91. Morrison JA, Friedman LA, Wang P, Glueck CJ. Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. *J Pediatr*. Feb 2008;152(2):201-206.
92. Freedman DS, Khan LK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. Sep 2001;108(3):712-718.
93. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet*. Oct 1992;340(8825):925-929.

94. Burrows R, Bugueño M, Leiva L, Ceballos X, Guillier I, Gattas V. Perfil metabólico de riesgo cardiovascular en niños y adolescentes obesos con menor sensibilidad insulínica. *Rev Med Chile*. 2005;133(7):795-804.
95. Juonala M, Magnussen CG, Venn A, et al. Influence of age on associations between childhood risk factors and carotid intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Childhood Determinants of Adult Health Study, the Bogalusa Heart Study, and the Muscatine Study for the International Childhood Cardiovascular Cohort (i3C) Consortium. *Circulation*. Dec 2010;122(24):2514-2520.
96. Cubbon RM, Kahn MB, Wheatcroft SB. Effects of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair. *Clin Sci (Lond)*. Sep 2009;117(5):173-190.
97. Dahl-Jorgensen K, Larsen JR, Hanssen KF. Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia*. Aug 2005;48(8):1445-1453.
98. Reinehr T, Wunsch R, de Sousa G, Toschke AM. Relationship between metabolic syndrome definitions for children and adolescents and intima-media thickness. *Atherosclerosis*. Jul 2008;199(1):193-200.
99. Woo KS, Chook P, Yu CW, et al. Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening. *Int J Obes Relat Metab Disord*. Jul 2004;28(7):852-857.
100. McGill HC, Jr., McMahan CA, Zieske AW, et al. Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circulation*. Jul 2000;102(4):374-379.
101. McGill HC, Jr., McMahan CA, Zieske AW, et al. Associations of coronary heart disease risk factors with the intermediate lesion of atherosclerosis in youth. The Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2000;20(8):1998-2004.
102. Juonala M, Jarvisalo MJ, Maki-Torkko N, Kahonen M, Viikari JS, Raitakari OT. Risk factors identified in childhood and decreased carotid artery elasticity in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation*. Sep 2005;112(10):1486-1493.
103. Iannuzzi A, Licenziati MR, Acampora C, et al. Carotid artery stiffness in obese children with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. Feb 2006;97(4):528-531.
104. Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, et al. Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. Feb 2009;119(4):628-647.
105. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med*. Apr 2004;350(14):1387-1397.
106. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. Mar 2000;342(12):836-843.
107. Ridker PM, Libby P. *Risk Factors for Atherothrombotic Disease*. Vol chap 39. Philadelphia: Elsevier; 2007.
108. Germolec D, Frawley R, Evans E. *Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols*. Vol 598; 2009.
109. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol*. 1983;34:141-212.

110. Du Clos TW. Pentraxins: Structure, Function, and Role in Inflammation. *ISRN Inflamm.* 2013;379040.
111. Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation.* Apr 2003;107(13):1783-1790.
112. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* Nov 2002;347(20):1557-1565.
113. Skinner AC, Steiner MJ, Henderson FW, Perrin EM. Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. *Pediatrics.* Apr 2010;125(4):e801-809.
114. Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis.* Mar 2000;149(1):139-150.
115. Festa A, D'Agostino R, Jr., Williams K, et al. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* Oct 2001;25(10):1407-1415.
116. Ford ES. C-reactive protein concentration and cardiovascular disease risk factors in children: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Circulation.* Sep 2003;108(9):1053-1058.
117. Retnakaran R, Zinman B, Connelly PW, Harris SB, Hanley AJ. Nontraditional cardiovascular risk factors in pediatric metabolic syndrome. *J Pediatr.* Feb 2006;148(2):176-182.
118. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Low-grade systemic inflammation in overweight children. *Pediatrics.* Jan 2001;107(1):E13.
119. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *Jama.* Dec 1999;282(22):2131-2135.
120. Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation.* Apr 2002;105(16):1890-1896.
121. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* Oct 2000;102(18):2165-2168.
122. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* Jan 2003;107(3):499-511.
123. McGill HC, Jr., McMahan CA. Starting earlier to prevent heart disease. *Jama.* Nov 2003;290(17):2320-2322.
124. Kavey RE, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Taubert K. American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Circulation.* Mar 2003;107(11):1562-1566.
125. Porkka KV, Viikari JS, Taimela S, Dahl M, Akerblom HK. Tracking and predictiveness of serum lipid and lipoprotein measurements in childhood: a 12-year follow-up. The Cardiovascular Risk in Young Finns study. *Am J Epidemiol.* Dec 1994;140(12):1096-1110.
126. Clarke WR, Schrott HG, Leaverton PE, Connor WE, Lauer RM. Tracking of blood lipids and blood pressures in school age children: the Muscatine study. *Circulation.* Oct 1978;58(4):626-634.
127. Tonstad S, Joakimsen O, Stensland-Bugge E, et al. Risk factors related to carotid intima-media thickness and plaque in children with familial hypercholesterolemia and control subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Aug 1996;16(8):984-991.

128. Jarvisalo MJ, Jartti L, Nanto-Salonen K, et al. Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation*. Dec 2001;104(24):2943-2947.
129. Pauciuillo P, Iannuzzi A, Sartorio R, et al. Increased intima-media thickness of the common carotid artery in hypercholesterolemic children. *Arterioscler Thromb*. Jul 1994;14(7):1075-1079.
130. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. Mar 2002;105(9):1135-1143.
131. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein and its role in the pathogenesis of myocardial infarction. *Ital Heart J*. Nov 2001;2(11):804-806.
132. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. Jan 1999;340(2):115-126.
133. Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y, et al. Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2003;23(8):1398-1404.
134. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. Feb 2003;41(4 Suppl S):37S-42S.
135. Jarvisalo MJ, Harmoinen A, Hakanen M, et al. Elevated serum C-reactive protein levels and early arterial changes in healthy children. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2002;22(8):1323-1328.
136. Zieske AW, Tracy RP, McMahan CA, et al. Elevated serum C-reactive protein levels and advanced atherosclerosis in youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jun 2005;25(6):1237-1243.
137. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev*. Jun 2007;65(6 Pt 2):S7-12.
138. Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K, McIntosh M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr*. Jan 2009;139(1):1-4.
139. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*. Sep 2009;54(9):1847-1856.
140. Valenzuela A. Tejido adiposo: Algo mas que grasa corporal. *Rev Esp de Obes*. 2004;2(6):327-350.
141. Sattar N, Gaw A, Scherbakova O, et al. Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation*. Jul 2003;108(4):414-419.
142. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. Jan 2003;107(3):391-397.
143. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. Apr 1997;336(14):973-979.
144. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Apr 1999;19(4):972-978.
145. Festa A, D'Agostino R, Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. Jul 2000;102(1):42-47.
146. Frohlich M, Imhof A, Berg G, et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care*. Dec 2000;23(12):1835-1839.

147. Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Inflammation and microalbuminuria in nondiabetic and type 2 diabetic subjects: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Kidney Int.* Oct 2000;58(4):1703-1710.
148. Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes.* Apr 2002;51(4):1157-1165.
149. Festa A, D'Agostino R, Jr., Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.* Apr 2002;51(4):1131-1137.
150. Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia.* Nov 1999;42(11):1367-1374.
151. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia.* Oct 1998;41(10):1241-1248.
152. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *Jama.* May 2001;285(19):2481-2485.
153. Pradhan AD, Ridker PM. Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur Heart J.* Jun 2002;23(11):831-834.
154. Akinci G, Coskun S, Akinci B, et al. Atherosclerosis risk factors in children of parents with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* Oct 2007;194(2):e165-171.
155. Obrant KJ, Kakonen SM, Astermark J, et al. The proportion of carboxylated to total or intact osteocalcin in serum discriminates warfarin-treated patients from control subjects. *J Bone Miner Res.* Apr 1999;14(4):555-560.
156. Gorai I, Hosoda K, Chaki O, et al. A heterogeneity in serum osteocalcin N-terminal fragments in Paget's disease: a comparison with other biochemical indices in pre- and postmenopause. *Calcif Tissue Int.* Dec 1998;63(6):459-465.
157. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem.* Jul 2000;37 (Pt 4):432-446.
158. Seibel MJ. Biochemical markers of bone remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Mar 2003;32(1):83-113, vi-vii.
159. Gerdhem P, Isaksson A, Akesson K, Obrant KJ. Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* Dec 2005;16(12):1506-1512.
160. Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev.* Oct 1996;54(10):332-333.
161. García-Martín A, Reyes-García R, Ávila-Rubio V, Muiñoz-Torres M. Osteocalcina:nexo de unión entre homeostasis ósea y metabolismo energético. *Endocrinol Nutr* 2013;60(5):260-263.
162. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 2008;105(13):5266-5270.
163. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* Aug 2007;130(3):456-469.
164. Motyl KJ, McCabe LR, Schwartz AV. Bone and glucose metabolism: a two-way street. *Arch Biochem Biophys.* Nov 2010;503(1):2-10.

165. Brenner B, Sanchez-Vega B, Wu SM, Lanir N, Stafford DW, Solera J. A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood*. Dec 1998;92(12):4554-4559.
166. Sokoll LJ, Sadowski JA. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr*. Apr 1996;63(4):566-573.
167. Kinoshita H, Nakagawa K, Narusawa K, et al. A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin-K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Gln) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women. *Bone*. Feb 2007;40(2):451-456.
168. Bugel S. Vitamin K and bone health in adult humans. *Vitam Horm*. 2008;78:393-416.
169. Erkkila AT, Booth SL. Vitamin K intake and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. Feb 2008;19(1):39-42.
170. Shyu HY, Fong CS, Fu YP, et al. Genotype polymorphisms of GGCX, NQO1, and VKORC1 genes associated with risk susceptibility in patients with large-artery atherosclerotic stroke. *Clin Chim Acta*. Jun 2010;411(11-12):840-845.
171. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2000;20(8):1926-1931.
172. Prats-Puig A, Mas-Parareda M, Riera-Perez E, et al. Carboxylation of osteocalcin affects its association with metabolic parameters in healthy children. *Diabetes Care*. Mar 2010;33(3):661-663.
173. Idelevich A, Rais Y, Monsonego-Ornan E. Bone Gla protein increases HIF-1alpha-dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Sep 2011;31(9):e55-71.
174. Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, Schoen FJ. Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 1999;19(8):1852-1861.
175. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol*. Nov 1983;113(2):143-155.
176. Okura T, Kurata M, Enomoto D, et al. Undercarboxylated osteocalcin is a biomarker of carotid calcification in patients with essential hypertension. *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(1):66-71.
177. Okazaki R, Totsuka Y, Hamano K, et al. Metabolic improvement of poorly controlled noninsulin-dependent diabetes mellitus decreases bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab*. Sep 1997;82(9):2915-2920.
178. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, et al. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan 2009;94(1):45-49.
179. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. Mar 2009;94(3):827-832.
180. Fernandez-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, et al. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan 2009;94(1):237-245.
181. Luo XH, Guo LJ, Xie H, et al. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res*. Oct 2006;21(10):1648-1656.

182. Williams GA, Wang Y, Callon KE, et al. In vitro and in vivo effects of adiponectin on bone. *Endocrinology*. Aug 2009;150(8):3603-3610.
183. Sakamoto N, Nishiike T, Iguchi H, Sakamoto K. Relationship between acute insulin response and vitamin K intake in healthy young male volunteers. *Diabetes Nutr Metab*. Feb 1999;12(1):37-41.
184. Cioffi M, Molinari AM, Gazzero P, et al. Serum osteocalcin in 1634 healthy children. *Clin Chem*. Mar 1997;43(3):543-545.
185. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec 2001;21(12):1998-2003.
186. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest*. May 1994;93(5):2106-2113.
187. Luo G, Ducey P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. Mar 1997;386(6620):78-81.
188. Pal SN, Rush C, Parr A, Van Campenhout A, Golledge J. Osteocalcin positive mononuclear cells are associated with the severity of aortic calcification. *Atherosclerosis*. May 2010;210(1):88-93.
189. Gossl M, Modder UI, Atkinson EJ, Lerman A, Khosla S. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. Oct 2008;52(16):1314-1325.
190. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol*. Dec 2003;14(6):561-566.
191. Khosla S, Atkinson EJ, Riggs BL, Melton LJ, 3rd. Relationship between body composition and bone mass in women. *J Bone Miner Res*. Jun 1996;11(6):857-863.
192. Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, et al. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res*. Sep 1999;14(9):1622-1627.
193. Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. May 2007;92(5):1640-1646.
194. Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, Blumsohn A, Eastell R. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone*. Jun 2002;30(6):886-890.
195. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducey P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone*. Feb 2012;50(2):568-575.
196. Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev*. Nov 2009;25(8):768-772.
197. Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. Circulating osteocalcin level is associated with improved glucose tolerance, insulin secretion and sensitivity independent of the plasma adiponectin level. *Osteoporos Int*. Apr 2012;23(4):1337-1342.
198. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, et al. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res*. May 2009;24(5):785-791.
199. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. Jan 2011;22(1):187-194.

200. Bao Y, Zhou M, Lu Z, et al. Serum levels of osteocalcin are inversely associated with the metabolic syndrome and the severity of coronary artery disease in Chinese men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Aug 2011;75(2):196-201.
201. Tan A, Gao Y, Yang X, et al. Low serum osteocalcin level is a potential marker for metabolic syndrome: results from a Chinese male population survey. *Metabolism*. Aug 2011;60(8):1186-1192.
202. Zhang Y, Qi L, Gu W, et al. Relation of serum osteocalcin level to risk of coronary heart disease in Chinese adults. *Am J Cardiol*. Nov 2010;106(10):1461-1465.
203. Polgreen LE, Jacobs DR, Jr., Nathan BM, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity (Silver Spring)*. Nov 2010;20(11):2194-2201.
204. Montalcini T, Emanuele V, Ceravolo R, et al. Relation of low bone mineral density and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Am J Cardiol*. Jul 2004;94(2):266-269.
205. Reyes-Garcia R, Rozas-Moreno P, Jimenez-Moleon JJ, et al. Relationship between serum levels of osteocalcin and atherosclerotic disease in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. Feb 2012;38(1):76-81.
206. Sheng L, Cao W, Cha B, Chen Z, Wang F, Liu J. Serum osteocalcin level and its association with carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. Jan 2013;12:22.
207. Liu JJ, Toy WC, Wong MD, et al. Elevated undercarboxylated and reduced carboxylated osteocalcin are associated with metabolic syndrome in middle age Asian females. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. Jun 2013;121(6):329-333.
208. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. Feb 1970;45(239):13-23.
209. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. Jun 1969;44(235):291-303.
210. Carrascosa Lezcano A, Fernandez Garcia JM, Fernandez Ramos C, et al. [Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood]. *An Pediatr (Barc)*. Jun 2008;68(6):552-569.
211. Formiguera X. Circunferencia de la cintura y riesgo cardiovascular en población española. *Clin Invest Arterioscl*. 2007;19:90-101.
212. Jaffrin MY, Morel H. Body fluid volumes measurements by impedance: A review of bioimpedance spectroscopy (BIS) and bioimpedance analysis (BIA) methods. *Med Eng Phys*. Dec 2008;30(10):1257-1269.
213. Hirooka M, Kumagi T, Kurose K, et al. A technique for the measurement of visceral fat by ultrasonography: comparison of measurements by ultrasonography and computed tomography. *Intern Med*. Aug 2005;44(8):794-799.
214. Ferrozzi F, Zuccoli G, Tognini G, et al. [An assessment of abdominal fatty tissue distribution in obese children. A comparison between echography and computed tomography]. *Radiol Med*. Dec 1999;98(6):490-494.
215. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. Jul 1985;28(7):412-419.
216. Hafner G, Endler T, Oppitz M, et al. Effects of standardization with the new international reference preparation for proteins in human serum on method comparability and reference values. *Clin Lab*. 1995;41:743-748.
217. Presnell SR, Stafford DW. The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb Haemost*. Jun 2002;87(6):937-946.

218. Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Falaschi F, Finardi G, Bellomo G. Low-density lipoprotein oxidation in essential hypertension. *J Hypertens*. Oct 1993;11(10):1103-1111.
219. Keidar S, Kaplan M, Shapira C, Brook JG, Aviram M. Low density lipoprotein isolated from patients with essential hypertension exhibits increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II. *Atherosclerosis*. May 1994;107(1):71-84.
220. Canete R, Gil-Campos M, Aguilera CM, Gil A. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. *Eur J Nutr*. Jun 2007;46(4):181-187.
221. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. Jan 2010;314(1):1-16.
222. Stabouli S, Kotsis V, Papamichael C, Constantopoulos A, Zakopoulos N. Adolescent obesity is associated with high ambulatory blood pressure and increased carotid intimal-medial thickness. *J Pediatr*. Nov 2005;147(5):651-656.
223. Dijk JM, van der Graaf Y, Bots ML, Grobbee DE, Algra A. Carotid intima-media thickness and the risk of new vascular events in patients with manifest atherosclerotic disease: the SMART study. *Eur Heart J*. Aug 2006;27(16):1971-1978.
224. Blackburn R, Giral P, Bruckert E, et al. Elevated C-reactive protein constitutes an independent predictor of advanced carotid plaques in dyslipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec 2001;21(12):1962-1968.
225. Wang TJ, Nam BH, Wilson PW, et al. Association of C-reactive protein with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 2002;22(10):1662-1667.
226. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*. Apr 2001;103(13):1813-1818.
227. Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation*. Apr 2002;105(17):2019-2023.
228. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*. Mar 2001;103(9):1194-1197.
229. Reynolds GD, Vance RP. C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch Pathol Lab Med*. Mar 1987;111(3):265-269.
230. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. Dec 1997;82(12):4196-4200.
231. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. Mar 1998;83(3):847-850.
232. Despres JP. The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. *Obes Res*. Apr 1998;6 Suppl 1:8S-17S.
233. Faintuch J, Bortolotto LA, Marques PC, Faintuch JJ, Franca JI, Cecconello I. Systemic inflammation and carotid diameter in obese patients: pilot comparative study with flaxseed powder and cassava powder. *Nutr Hosp*. Jan-Feb 2011;26(1):208-213.
234. Ishizu T, Ishimitsu T, Yanagi H, et al. Effect of age on carotid arterial intima-media thickness in childhood. *Heart Vessels*. Jul 2004;19(4):189-195.
235. Bohm B, Hartmann K, Buck M, Oberhoffer R. Sex differences of carotid intima-media thickness in healthy children and adolescents. *Atherosclerosis*. Oct 2009;206(2):458-463.

236. Denzer C, Weibel A, Muche R, Karges B, Sorgo W, Wabitsch M. Pubertal development in obese children and adolescents. *Int J Obes (Lond)*. Oct 2007;31(10):1509-1519.
237. He Q, Karlberg J. Bmi in childhood and its association with height gain, timing of puberty, and final height. *Pediatr Res*. Feb 2001;49(2):244-251.
238. Vercoza AM, Baldisserotto M, de Los Santos CA, Poli-de-Figueiredo CE, d'Avila DO. Cardiovascular risk factors and carotid intima-media thickness in asymptomatic children. *Pediatr Cardiol*. Nov 2009;30(8):1055-1060.
239. Johnson HM, Douglas PS, Srinivasan SR, et al. Predictors of carotid intima-media thickness progression in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Stroke*. Mar 2007;38(3):900-905.
240. Ensrud KE, Thompson DE, Cauley JA, et al. Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. Fracture Intervention Trial Research Group. *J Am Geriatr Soc*. Mar 2000;48(3):241-249.
241. Farhat GN, Newman AB, Sutton-Tyrrell K, et al. The association of bone mineral density measures with incident cardiovascular disease in older adults. *Osteoporos Int*. Jul 2007;18(7):999-1008.
242. Magnus JH, Broussard DL. Relationship between bone mineral density and myocardial infarction in US adults. *Osteoporos Int*. Dec 2005;16(12):2053-2062.
243. Kim HW, Kang E, Im S, Ko YJ, Im SA, Lee JI. Prevalence of pre-stroke low bone mineral density and vertebral fracture in first stroke patients. *Bone*. Jul 2008;43(1):183-186.
244. Laroche M, Puech JL, Pouilles JM, et al. [Lower limb arteriopathy and male osteoporosis]. *Rev Rhum Mal Osteoartic*. Feb 1992;59(2):95-101.
245. Shea MK, Gundberg CM, Meigs JB, et al. Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. *Am J Clin Nutr*. Nov 2009;90(5):1230-1235.
246. Gundberg CM, Nieman SD, Abrams S, Rosen H. Vitamin K status and bone health: an analysis of methods for determination of undercarboxylated osteocalcin. *J Clin Endocrinol Metab*. Sep 1998;83(9):3258-3266.
247. Wells JC, Fuller NJ, Dewit O, Fewtrell MS, Elia M, Cole TJ. Four-component model of body composition in children: density and hydration of fat-free mass and comparison with simpler models. *Am J Clin Nutr*. May 1999;69(5):904-912.
248. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. Apr 1993;362(6423):801-809.
249. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*. Jun 1990;15(7):1667-1687.
250. Gardener H, Goldberg R, Mendez AJ, et al. Adiponectin and risk of vascular events in the Northern Manhattan study. *Atherosclerosis*. Feb 2013;226(2):483-489.
251. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. Sep 1997;96(5):1432-1437.
252. Hartford M, Wikstrand JC, Wallentin I, Ljungman SM, Berglund GL. Left ventricular wall stress and systolic function in untreated primary hypertension. *Hypertension*. Jan-Feb 1985;7(1):97-104.

