



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS y DE LA SALUD.  
CAMPO DE CONOCIMIENTO: CIENCIAS MÉDICAS,  
SEDE: INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

**EFLUJO DE COLESTEROL DE MACRÓFAGOS J774 DE RATÓN A LAS LIPOPROTEÍNAS  
DE ALTA DENSIDAD EN INDIVIDUOS CON FORMAS SUBCLÍNICAS DE HIPOTIROIDISMO Y  
ATEROSCLEROSIS.**

MODALIDAD DE GRADUACIÓN POR TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:  
JORGE FRANCISCO ACUÑA VALERIO

TUTOR:  
DR. CARLOS POSADAS ROMERO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS y DE LA SALUD.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. PEDRO ANTONIO REYES LÓPEZ  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS y DE LA SALUD.  
DR. CARLOS POSADAS ROMERO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS y DE LA SALUD.  
DRA. MARÍA DEL CARMEN CRAVIOTO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS y DE LA SALUD.  
DR. ERICK ALEXÁNDERSON ROSAS  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS y DE LA SALUD.  
DRA. PATRICIA MEDINA BRAVO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS y DE LA SALUD.

**Trabajo apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
(Proyecto # SALUD-2010-2-150537)**

MÉXICO, D.F., JUNIO DE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## 1.- Lista de Abreviaciones.

<b>Concepto</b>	<b>Abreviación</b>
Alanino Amino Transferasa	ALT
Apolipoproteína	Apo
Aspartato Amino Transferasa	AST
Calcio Arterial Coronario	CAC
Colesterol Total	CT
Colesterol ligado a Lipoproteínas de Alta Densidad	C-HDL
Colesterol ligado a Lipoproteínas de Baja Densidad	C-LDL
Enfermedad Arterial Coronaria	EAC
Eflujo de Colesterol	EC
Eutiroidismo, Eutiroideos	EU
Factor(es) de Riesgo Coronario, Factor(es) de Riesgo Cardiovascular	FRC
Fosfatasa Alcalina	ALP
Gamma Glutamil Transpeptidasa	GGT
Genética de la Enfermedad Aterosclerosa	GEA
Grasa Abdominal Subcutánea	GAS
Grasa Abdominal Total	GAT
Grasa Abdominal Visceral	GAV
Hígado Graso	HG
Hipotiroidismo Subclínico, Hipotiroideos Subclínicos	HSC
Hormona estimulante de la tiroides	TSH
Índice de atenuación Hígado:Bazo	IAH:B
Índice de masa corporal	IMC

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"	INCICH
Lecitin Colesterol Acil Transferasa	LCAT
Lipoproteínas de Alta Densidad	HDL
Lipoproteínas de Baja Densidad	LDL
Modelo de resistencia a la insulina ( <i>Homestasis Model of Assesment</i> )	HOMA-RI
Mortalidad Cardiovascular	MCV
Presión Arterial Diastólica	TAD
Presión Arterial Sistólica	TAS
Proteína C Reactiva	PCR
Razón de Momios	RM
Riesgo Cardiovascular	RCV
Riesgo Relativo	RR
Síndrome Metabólico	SM
Tiroxina	T4
Tiroxina, fracción libre de	T4L
Transporte Reverso de Colesterol	TRC
Triglicéridos	TG

## 2.- Índice

	<b>Página</b>
1.- Lista de Abreviaciones.	2
2.- Índice.	4
3.- Antecedentes.	5
3.1 Disfunción tiroidea subclínica y enfermedad cardiovascular.	5
3.1.1 HSC, enfermedad arterial coronaria y mortalidad cardiovascular.	5
3.1.2 HSC y su relación con el metabolismo de los lípidos.	6
3.1.3 HSC y su relación con disfunción endotelial, inflamación y síndrome metabólico.	8
3.2 Características de las HDL y su importancia como factor de riesgo coronario.	8
3.2.1 Transporte reverso y eflujo de colesterol.	9
3.2.2 Funcionalidad de HDL en estados proinflamatorios.	10
4.- Planteamiento del Problema.	10
5.- Justificación.	11
6.- Pregunta de Investigación.	12
7.- Hipótesis.	12
8.- Objetivos.	13
9.- Metodología.	13
9.1 Tipo de estudio.	13
9.2 Población elegible y criterios de inclusión y exclusión.	14
9.3 Procedimientos y mediciones.	15
9.4 Análisis estadístico.	18
10.- Resultados.	18
11.- Discusión.	28
12.- Conclusión.	31
13.- Referencias Bibliográficas.	32

### 3.- Antecedentes.

#### 3.1 Disfunción Tiroidea Subclínica y Enfermedad Cardiovascular.

Las hormonas tiroideas tienen diversos efectos sobre el corazón y vasos sanguíneos. Desde hace mucho tiempo se relacionó tanto al hipertiroidismo como al hipotiroidismo con alteraciones cardiovasculares y metabólicas, como son aterosclerosis prematura, mayor incidencia de arritmias supraventriculares, anormalidades en el perfil de lípidos y alteraciones de la función ventricular. Más recientemente se ha estudiado si grados menores de disfunción tiroidea también se asocian a morbilidad y mortalidad cardiovascular (MCV).<sup>1</sup>

La disfunción tiroidea subclínica es una condición anormal caracterizada por la alteración de la concentración en suero de la tirotropina, u hormona estimulante de la tiroides (TSH), con valor normal de la fracción libre de la hormona tiroxina (T4L), en sujetos asintomáticos.<sup>2-3</sup> Se denomina hipotiroidismo subclínico (HSC) cuando la TSH se eleva, e hipertiroidismo subclínico cuando la TSH disminuye.<sup>3</sup> Casi siempre se debe a un proceso autoinmune, que puede evolucionar hacia la sustitución de la glándula por tejido fibroso.<sup>1,3</sup> El 80% de las personas con HSC tienen valor de TSH <10 mU/L.<sup>4</sup> Aunque su historia natural no está bien caracterizada, se sabe que tienen riesgo anual de 1-4% de desarrollar hipotiroidismo.<sup>3</sup>

El HSC es más común en personas mayores de 65 años, sobretodo en mujeres, y su prevalencia en población general oscila del 4-20%. Esta amplia variación en los diferentes estudios se debe a factores como son: raza, género, ingesta de yodo en la dieta, índice de masa corporal y diferentes niveles de corte utilizados para definir HSC.<sup>3</sup> En un estudio realizado en nuestro medio con muestreo no aleatorio, en el que casi el 90% de los sujetos eran menores de 40 años, se encontró una prevalencia de 9.8%.<sup>5</sup> En una investigación a nivel nacional que incluyó 781 adultos, obtenidos por muestreo aleatorio, la prevalencia fue de 8%. Sin embargo, esta muestra es heterogénea y no representa adecuadamente a las diferentes poblaciones de nuestro país.<sup>6</sup> En otro estudio en mexicanos de 18 a 70 años, seleccionados aleatoriamente en cinco estados de la república, se observó una prevalencia de 8.3%.<sup>7</sup>

##### *3.1.1 Hipotiroidismo subclínico, enfermedad arterial coronaria y riesgo cardiovascular.*

Inicialmente los niveles elevados de colesterol total (CT) explicaron el incremento en el riesgo de enfermedad arterial coronaria (EAC) en HSC.<sup>1, 4</sup> Posteriormente se estableció que en esta

asociación también influyen también otros factores como son la rigidez arterial, la presencia de obesidad o sobrepeso, el incremento en las resistencias vasculares sistémicas, la hipercoagulabilidad, y la disfunción endotelial. El ajuste por factores de riesgo coronario tradicionales no altera este hallazgo.<sup>8-9</sup>

Casi todos los estudios longitudinales han encontrado asociación entre HSC y EAC.<sup>10</sup> Hay algunos de ellos con seguimiento de más de dos décadas que favorecen esta observación.<sup>1,9</sup> En dos metaanálisis que en conjunto incluyeron casi 70 mil sujetos, se concluyó que el HSC incrementa el riesgo de eventos cardiovasculares y la mortalidad cardiovascular de forma moderada, principalmente en individuos menores de 65 años (RR 1.51 [IC95% 1.09-2.09]) y cuando el valor de TSH es superior a 10 mU/L, aunque ya desde 7 mU/L se observa esta asociación.<sup>2</sup> Analizando en conjunto la información de estos dos metaanálisis,<sup>2,8</sup> y de otros que se han publicado recientemente,<sup>11-13</sup> se concluye que el HSC incrementa el riesgo cardiovascular en menores de 70 años, no tiene efecto en los de 70 a 80, e incluso podría ser un factor protector en los mayores de 80 años, por lo que el impacto del HSC sobre el riesgo cardiovascular (RCV) es controversial.<sup>4</sup> Se ha observado también que este grado de disfunción tiroidea incrementa levemente la mortalidad cardiovascular (HR 1.42 [IC95% 1.03-1.95] para TSH de 7 a 10 mU/L y HR 1.58 [IC95% 1.10-2.27] para TSH de 10 a 19.9 mU/L).<sup>8</sup>

Se ha encontrado que en comparación con los individuos eutiroideos (EU), los sujetos aparentemente sanos con HSC tienen mayor índice de calcio arterial coronario (CAC),<sup>14</sup> el cual es considerado un marcador de aterosclerosis coronaria. También se ha descrito mayor calcificación arterial aórtica en los sujetos con HSC, que es considerado un marcador de aterosclerosis periférica.<sup>4, 15</sup> Un estudio reportó mayor prevalencia de TSH elevada en los pacientes con EAC, definida por angiografía coronaria, respecto a aquellos sin EAC.<sup>16</sup>

### *3.1.2 Hipotiroidismo subclínico y su relación con el metabolismo de los lípidos.*

El HSC se ha asociado con dislipidemia, caracterizada por elevación del CT y del colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL). El nivel de CT y C-LDL se eleva claramente en el hipotiroidismo franco, y sólo discreta pero significativamente en HSC. Se tiene bien establecido que a mayor grado de disfunción tiroidea las alteraciones en los lípidos son más manifiestas, sin embargo, no todos los estudios han mostrado la asociación entre HSC y elevación del CT y C-LDL.<sup>1, 17-18</sup> Las alteraciones en otro tipo de lípidos, como los triglicéridos (TG), el C-HDL y

lipoproteína(a) han sido aún más controversiales. A pesar de ello, se estima que 1-11% de pacientes con dislipidemia tienen algún grado de disfunción tiroidea subclínica.<sup>18</sup>

El C-LDL elevado se relaciona directamente con la acumulación de colesterol en los macrófagos de la pared arterial.<sup>19</sup> El exceso de C-LDL, la presencia de moléculas LDL pequeñas y densas, el mayor tiempo de residencia en el compartimento intravascular, y su mayor penetración al espacio subendotelial, favorecen modificaciones bioquímicas en las LDL, entre las que se incluye la oxidación, que les confiere citotoxicidad y aterogenicidad.<sup>20</sup> La susceptibilidad de las LDL a la oxidación depende de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados, de los antioxidantes presentes en la partícula, del grado de glucosilación, de la presencia de radicales libres, y del tiempo de exposición a ellos.<sup>19</sup> Tanto en el hipotiroidismo como en el HSC existe aumento en la oxidación de LDL.<sup>18, 21</sup> También hay reportes sobre partículas de LDL alteradas en tamaño en HSC, pero los hallazgos no son consistentes.<sup>18, 21</sup> Todas estas alteraciones en las LDL se podrían explicar por cambios en el metabolismo de estas moléculas que son regulados por la glándula tiroides.<sup>18</sup>

Se han realizado ensayos clínicos y en algunos se observó que al administrar tiroxina (T4), los valores de C-LDL y CT disminuyen,<sup>3</sup> pero se han encontrado menores cambios en el valor de triglicéridos (TG) o colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL).<sup>1, 9</sup> En los estudios de intervención que han resultado negativos se ha postulado que podría deberse a un poder inadecuado, debido al tamaño de la muestra o al tiempo de seguimiento.<sup>18</sup>

Como se ha mencionado, en algunos estudios se ha encontrado que el HSC se asocia a disminución del valor de C-HDL, pero, este hallazgo no ha sido consistente.<sup>18</sup> De la misma manera, en estudios de intervención, el efecto de la T4 sobre el nivel de C-HDL ha sido menos evidente que el cambio que se presenta en C-LDL.<sup>18, 22</sup> Se ha identificado que varias proteínas relacionadas con el metabolismo de C-HDL se ven afectadas en el hipotiroidismo, como son la proteína de transferencia de ésteres de colesterol, lecitina colesterol acil transferasa (LCAT), lipasa hepática, receptor pepenador clase B (SR-BI), y paraoxonasa (PON-1). La mayoría de estos datos procedentes de modelos murinos.<sup>22-23</sup> Los niveles de apolipoproteína A-1 (Apo A1) se han encontrado disminuidos en HSC.<sup>22</sup>



### *3.1.3 Hipotiroidismo subclínico y su relación con disfunción endotelial, inflamación y síndrome metabólico.*

Se ha relacionado al HSC con disfunción endotelial a través de varios mecanismos, independientes a los factores de riesgo coronario. El valor de proteína C reactiva (PCR) se ha encontrado elevado con grados crecientes de HSC, lo que sugiere que es un estado proinflamatorio.<sup>24</sup> También se ha relacionado al HSC con incremento de la homocisteína, insulina, IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral, moléculas de adhesión intercelular, cambios en los factores de coagulación, menor vasodilatación mediada por endotelio, y aumento de la rigidez arterial y del grosor de la íntima carotídea.<sup>1, 24-25</sup> Sin embargo, estas asociaciones no han sido consistentes.<sup>9, 23, 26</sup>

Algunas de estas anomalías ya han sido estudiadas en mexicanos. En una población adulta de 3148 individuos, se observó que una disminución de la función tiroidea, incluso en aquellos que permanecían en la categoría de EU, se asocia con valores más elevados de CT, glucosa, insulina y del índice HOMA-RI, pero no a una mayor prevalencia de síndrome metabólico (SM) según la definición del ATP III.<sup>7</sup>

Los estados proinflamatorios, como son la diabetes, la enfermedad renal crónica, y las enfermedades autoinmunes, se han relacionado con incremento en el estrés oxidativo, anomalías aterogénicas de lípidos, resistencia a la insulina, endurecimiento arterial y disfunción endotelial. Las alteraciones antes descritas sugieren que el HSC es un estado proinflamatorio, y que estos fenómenos ocurren más probablemente en estos individuos.<sup>27</sup>

### 3.2 Características de las HDL y su importancia como factor de riesgo coronario.

Las HDL son complejos macromoleculares, constituidos por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y por apolipoproteínas (Apo). La Apo-1 es la proteína estructural más importante de las HDL. La fracción proteica representa el 55-60% de su masa, mayor proporción respecto a las demás lipoproteínas. Los lípidos anfipáticos se organizan en una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso. Las Apo estabilizan la monocapa lipídica. Los lípidos no polares son insolubles en un medio acuoso como el plasma y en consecuencia se sitúan en el interior de las lipoproteínas. Esto evita las interacciones con grupos polares que serían fisicoquímicamente desfavorables.<sup>28</sup>

Las HDL son un grupo heterogéneo de partículas lipoproteicas grandes (HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub>) y pequeñas (HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub>, y HDL<sub>3c</sub>), que tienen diferente composición lipídica, densidad, tamaño y función. Las moléculas inicialmente tienen forma discoide, pero al ir incorporando lípidos a su estructura, adquieren una configuración esférica.<sup>29</sup>

Es bien conocido desde hace varias décadas que la disminución de C-HDL aumenta el RCV.<sup>22, 29-30</sup> A la inversa, se ha determinado que por cada incremento de 1 mg/dL en el valor de C-HDL, el RCV disminuye 2-3%. Esta información procede tanto de estudios observacionales como de estudios de intervención.<sup>30-31</sup>

Recientemente se ha observado que algunas características de las HDL pueden ser más importantes que la concentración de C-HDL para predecir el RCV.<sup>31</sup> En condiciones normales el efecto antiaterogénico, tanto de las partículas grandes como las pequeñas, es atribuible a su efecto en el transporte reverso del colesterol (TRC), y a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, y antitrombóticos.<sup>30-31</sup>

### *3.2.1 Transporte reverso y eflujo de colesterol.*

Desde 1982 se demostró que las HDL pueden aceptar colesterol de las células. El TRC consiste en toda la serie de mecanismos que se inician con la incorporación del colesterol de las células periféricas a la molécula HDL, llamado eflujo de colesterol (EC), y que culmina con el metabolismo hepático de estas proteínas.<sup>30</sup> El EC es entonces el paso más temprano en el TRC de las células periféricas hacia el hígado, donde es reciclado o excretado por la bilis.<sup>29, 32</sup> Este proceso es mediado por las proteínas transportadoras de membrana ABCA1 (*ATP-Binding Cassette*), ABCG1 y SR-BI, hacia las HDL.<sup>6, 29-30</sup> De estas últimas proteínas, ABCA1 es la responsable de la mayor parte de la adición de colesterol y fosfolípidos a las HDL pequeñas,<sup>31</sup> mientras que ABCG1 tiene un rol especial para la entrega de colesterol a partículas HDL de mayor tamaño.<sup>6, 29-30</sup> En la fisiopatología de la aterosclerosis tiene especial importancia ABCA1, ya que es la molécula transportadora de colesterol desde los macrófagos (células espumosas).<sup>31</sup>

La capacidad del suero de un individuo para aceptar colesterol depende de la distribución de las moléculas de HDL y de sus características funcionales, además de la expresión de las diferentes moléculas transportadoras de colesterol expresadas en la membrana de las células que donan el colesterol. Se ha demostrado que sueros con la misma concentración de C-HDL tienen capacidad diferente de captar colesterol, y que ésta correlaciona con el eflujo mediado por

ABCA1.<sup>31</sup> De esta forma, se ha establecido que el EC es una medición cuantitativa de la función de las HDL.<sup>33</sup>

El EC tiene relevancia clínica, ya que está inversamente relacionado con el grosor de la íntima carotídea, independientemente de las concentraciones de C-HDL y de Apo A-1. Además el EC ha mostrado una fuerte asociación inversa con la probabilidad de EAC determinada por angiografía.<sup>33</sup>

### *3.2.2 Funcionalidad de HDL en estados proinflamatorios.*

En modelos específicos de enfermedad inflamatoria crónica se ha descrito que la función de las HDL se encuentra alterada. Las lipoproteínas se oxidan, y se convierten en depósitos de moléculas como la proteína sérica amiloide, anticuerpos, o fracciones del complemento. Como resultado, la capacidad para remover colesterol de los tejidos periféricos disminuye. Estos cambios ocurren en ausencia de variaciones de la concentración del colesterol HDL.<sup>29, 34</sup>

Las citocinas inflamatorias y la PCR disminuyen la expresión de ABCA1, por lo que el EC mediado por esta proteína está particularmente alterado.<sup>29, 35</sup> La oxidación de los lípidos de las HDL altera la función de la LCAT, y por ende la capacidad para acumular lípidos en el interior de las partículas. Las moléculas de Apo A-1 son secuestradas en tejidos inflamados, por lo que la concentración sérica de HDL puede disminuir, y además las moléculas de Apo A-1 son reemplazadas por amiloide A, lo que altera su capacidad para transportar lípidos hacia el hígado.<sup>29</sup> Como efecto global de estas alteraciones, las HDL son convertidas a proteínas proinflamatorias, que aportan lípidos a los tejidos periféricos en lugar de removerlos. Además tienen la capacidad de oxidar las LDL, en vez de protegerlas.<sup>36</sup>

## **4.- Planteamiento del Problema.**

Existen aspectos no conocidos sobre las asociaciones entre HSC y EAC. Inicialmente se consideró la elevación del CT y C-LDL como el factor que aceleraba la aterosclerosis en el HSC, pero posteriormente se observó que la asociación era independiente de estos factores y de otros como son obesidad e hipertensión. No se ha definido de forma adecuada la participación de

otros factores de riesgo coronario (FRC) como son: proteína C reactiva, nivel de insulina, resistencia a la insulina, adiponectina, presencia de hígado graso, y anomalías cualitativas de lípido-proteínas, en la asociación entre HSC y EAC.

Aunque en los estudios longitudinales se han encontrado resultados más consistentes entre el HSC y los eventos cardíacos, los estudios transversales han mostrado menos uniformidad en sus observaciones,<sup>2, 4</sup> ya que en algunos se ha determinado que el HSC se asocia a ciertos FRC, pero en otros estudios no. De la misma manera, los resultados de los ensayos clínicos en donde se ha administrado terapia con hormona tiroidea también han generado resultados controversiales.

Recientemente se ha postulado que el HSC es un estado proinflamatorio, y se piensa que esta anomalía podría contribuir a la aterogénesis acelerada que se ha observado en algunos estudios.<sup>24</sup> Sin embargo esto no ha sido precisado de forma adecuada. Tampoco se ha estudiado si las partículas de HDL presentan alteraciones estructurales o funcionales en sujetos con HSC. En este mismo tenor, no se ha establecido si el TRC, o particularmente el EC, se encuentran alterados en los sujetos con HSC. Este método ha sido ampliamente validado para el estudio de la funcionalidad de las HDL,<sup>30-31</sup> y se ha encontrado que personas con aterosclerosis tienen EC disminuido. En vista de que varios FRC están alterados en las personas con HSC, nos ha parecido conveniente precisar estas asociaciones, y establecer si el EC se encuentra disminuido.

## **5.- Justificación.**

Aún hay varios puntos sin definir claramente en torno a la relación entre HSC y EAC. En una revisión publicada por la Clínica Mayo se define como insuficiente la calidad de la evidencia científica sobre la asociación entre el HSC y los eventos cardíacos adversos, y la asociación entre el HSC y las alteraciones en los lípidos.<sup>4</sup> Debido a los dilemas presentes, los autores sugirieron continuar con esta línea de investigación.

De acuerdo a esta observación, nos parece importante, tanto desde el punto de vista clínico como del etiopatogénico, conocer con mayor precisión las alteraciones cuantitativas y cualitativas de las HDL (incluyendo el EC), así como la presencia de otros FRC que puedan presentarse en

los sujetos con HSC, y de esta manera ayudar a identificar el mecanismo que explique el incremento del RCV en HSC que se ha observado en algunos estudios.

De identificarse estas asociaciones, y acumularse más evidencia que vincule al HSC con un incremento del RCV, sería obligado hacer una mejor detección de HSC en la población general, y recomendar más ampliamente el tratamiento sustitutivo tiroideo.

## **6.- Pregunta de Investigación**

¿El eflujo de colesterol de macrófagos J774 de ratón a las lipoproteínas de alta densidad está disminuido en sujetos con hipotiroidismo y aterosclerosis subclínicos respecto a aquellos sujetos con función tiroidea normal y sin aterosclerosis subclínica?

## **7.- Hipótesis.**

H1: El eflujo de colesterol de macrófagos J774 de ratón a las lipoproteínas de alta densidad está disminuido en sujetos con HSC y EAC subclínica definida por la presencia de CAC.

H0: El eflujo de colesterol de macrófagos J774 de ratón a las lipoproteínas de alta densidad no está disminuido en sujetos con HSC y EAC subclínica definida por la presencia de CAC.

## **8.- Objetivos.**

### Objetivo Principal.

Evaluar si existe disminución del eflujo de colesterol de macrófagos J774 de ratón a las lipoproteínas de alta densidad en sujetos con HSC y aterosclerosis subclínica.

### Otros objetivos.

Estimar la prevalencia de HSC en la población de estudio, y su asociación con aterosclerosis subclínica.

Estudiar las asociaciones entre HSC y diferentes FRC, entre los que se incluyen edad, género masculino, obesidad, dislipidemia, tabaquismo, diabetes, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, PCR, hígado graso y síndrome metabólico.

Investigar si la asociación del HSC con la aterosclerosis coronaria es independiente o está mediada por otros FRC.

## **9.- Metodología.**

### 3.1 Tipo y Diseño de estudio

Se trata de un estudio observacional, transversal y analítico. Se realizó con una subpoblación del estudio “Genética de la Enfermedad Aterosclerosa” (GEA), que se lleva a cabo en el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICh), y que estudia las características clínicas y genéticas de la aterosclerosis en mestizos mexicanos. Inicialmente se compararon los sujetos que presentaron HSC contra sus contrapartes con función tiroidea conservada, y posteriormente se compararía a los sujetos con HSC y aterosclerosis subclínica, contra aquellos con HSC sin aterosclerosis subclínica, y contra los EU con aterosclerosis subclínica, como se especifica adelante (ver Cuadro 1).

### 3.2 Población elegible y criterios de inclusión y de exclusión

Se incluyeron adultos de 30 años o más, de ambos géneros, mexicanos de nacimiento, con padres y abuelos mexicanos, sin historia familiar de EAC prematura, y sin manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular. Se excluyeron las personas que no aceptaron participar en el estudio o firmar el consentimiento informado, sujetos con historia de distiroidismo o cardiopatía, personas con enfermedad renal, hepática u oncológica de cualquier tipo, y sujetos con tratamiento regulador de lípidos, hormonas esteroideas o amiodarona. Los participantes fueron incluidos por medio de muestreo por conveniencia (por casos consecutivos). La población fue seleccionada de sujetos que acudieron al Banco de Sangre del Instituto con fines de donación, o de aquellos que fueron invitados a participar a por medio de carteles colocados en centros sociales. Por ser un primer estudio que aborda la funcionalidad de HDL en HSC, se consideró de tipo piloto. Se planeó estudiar aproximadamente a 1000 individuos, de los cuales se esperaba encontrar alrededor de 100 sujetos para llevar a cabo la medición del EC.

Aquellos sujetos con valores de TSH  $>4.5$  mU/L, con T4L dentro del rango de referencia (0.9-1.7 ng/dL), fueron considerados como portadores de HSC. Se decidió seleccionar 4.5 mU/L como valor de referencia por ser el más utilizado en la literatura. A partir de este punto de corte se ha observado aumento del RCV en diferentes estudios, incluyendo metaanálisis,<sup>2, 8</sup> y además por ser el punto de corte que utilizó el Instituto de Salud Pública para establecer la prevalencia de HSC en mexicanos.<sup>6</sup> La mayoría de los estudios no han medido T4L a toda su población, sino sólo a aquellos individuos con TSH anormal, sin embargo, para tener mayor precisión en la clasificación de nuestros sujetos, se optó por medir T4L al total de la población. La condición de EAC subclínica se definió con base a la presencia de CAC en el estudio tomográfico. Se planeó estratificarlos de acuerdo a la presencia de CAC ( $<1$  o  $\geq 1$  unidades Agatson), considerada como un subrogado de aterosclerosis subclínica, y a la presencia de HSC, conformando así 4 grupos (Cuadro 1): Grupo 1 con  $CAC \geq 1$  y TSH eleva, Grupo 2 con  $CAC < 1$  y TSH elevada, Grupo 3 con  $CAC < 1$  y TSH normal, y Grupo 4 con  $CAC \geq 1$  y TSH normal. De acuerdo a la prevalencia reportada en población abierta de HSC y EAC, se esperaba identificar a 20-45 individuos en el Grupo 1. Se decidió determinar el EC en todos los individuos que formaran parte de este grupo, y se tomaría un control pareado por edad y género de los Grupos 2 y 3, para realizar la misma medición.

Cuadro 1. Subpoblaciones estimadas para el análisis del EC con base a las prevalencias conocidas de HSC y CAC.

	<b>CAC ≥1</b>	<b>CAC &lt;1</b>	<b>Total* =</b>
<b>TSH elevada</b>	20-45 Grupo 1	80-105 Grupo 2	100-150
<b>TSH normal</b>	180-255 Grupo 4	620-695 Grupo 3	800-950
<b>Total*</b>	200-300	700-800	N = 900-1100

\* Valores aproximados

### 3.3 Procedimientos y mediciones.

Se aplicó un cuestionario estandarizado para obtener información sobre aspectos demográficos (edad, género, medio socioeconómico, escolaridad y ocupación), patrones de actividad física, de alimentación, y antecedentes familiares y personales de FRC (obesidad, dislipidemia, diabetes, hipertensión arterial sistémica y tabaquismo). La dieta habitual durante el año previo fue evaluada utilizando un cuestionario de frecuencias de consumo, diseñado y validado por el Instituto Nacional de Salud Pública.<sup>37</sup> La actividad física fue cuantificada mediante un cuestionario que proporciona información sobre frecuencia, intensidad y duración de la actividad, lo que le confiere particular utilidad para analizar la relación que tiene con variables de RCV.<sup>38</sup>

Se realizó antropometría (peso, estatura y circunferencia abdominal) y una exploración física dirigida a toma de frecuencia cardíaca y tensión arterial. El peso se midió en una báscula calibrada, y la talla utilizando un estadímetro de pared SECA 222 (Hamburgo, Alemania). El índice de masa corporal (IMC) fue calculado con la fórmula = peso (kg) / talla (m<sup>2</sup>). La circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio, en el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la última costilla y la cresta iliaca. La tensión arterial (TA) fue medida en posición sedente, después de por lo menos cinco minutos de reposo, utilizando un esfigmomanómetro digital Welch Allyn, series 52000 (Skaneateles Falls, N.Y, E.U.A.), y el promedio de las dos últimas de tres mediciones consecutivas se utilizó en el análisis.

En ayuno de 12 horas, se colectaron 45 ml de sangre venosa, en la que se determinaron: TSH, T4L, glucosa, CT, C-HDL, C-LDL, TG, insulina, creatinina, ácido úrico, fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), PCR, Apo A-1 y Apo B. Se colectaron en tubos con EDTA y en tubos sin anticoagulante. Después de centrifugar en frío, el plasma y el suero fueron divididos en 16 alícuotas. A las alícuotas de plasma se les añadió inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 KIU/ml, Benzamidina 1mm). Todas las alícuotas fueron almacenadas a -70° C. Los lípidos,



lipoproteínas, enzimas hepáticas y glucosa fueron cuantificados en muestras frescas. Las determinaciones de CT, TG, glucosa en plasma y enzimas hepáticas se realizaron en un autoanalizador Hitachi 902 (Boheringer, Mannheim), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania y Wako Chemicals, E.U.A). El colesterol de las C-HDL fue determinado mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania).<sup>39</sup> El C-LDL fue calculado con la fórmula de Friedewald modificada por De Long.<sup>40</sup> Las concentraciones de PCR de alta sensibilidad, Apo B y Apo A-1, se determinaron por inmunonefelometría (BN Pro Spec Nephelometer, Dade Behring Marburg GmbH, Ge.). En el laboratorio de endocrinología la precisión y exactitud de las determinaciones de lípidos son evaluadas periódicamente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, GA (CDC, por sus siglas en inglés). Las concentraciones de insulina en suero se determinaron por radioinmunoanálisis (Coat-A-count; Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Se estimó la resistencia a la insulina empleando el modelo de homeostasis (HOMA-RI).<sup>41</sup> Los coeficientes de variación intra e inter ensayo en este laboratorio son inferiores al 10%. Todas las mediciones bioquímicas se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología del INCICH. La existencia de dislipidemia fue considerada con valores de CT >200mg/dl, TG ≥150mg/dl, C-HDL <40 mg/dl y C-LDL ≥130 mg/dl. La hipertensión arterial se definió con cifras ≥140/90 o uso de medicamentos antihipertensivos. El sobrepeso fue definido como IMC de 25 a 29.9 Kg/m<sup>2</sup>, y la obesidad como IMC ≥30 kg/m<sup>2</sup>. Los valores de circunferencia de cintura ≥80 cm en mujeres y ≥90 cm en hombres definieron la obesidad abdominal. Glucosa en ayuno de 100 a 125 mg/dl se consideró como alterada, mientras que los valores ≥126 mg/dl o el tratamiento con hipoglucemiantes definieron la presencia de diabetes mellitus. Se consideraron fumadores los individuos que consumen más de un cigarrillo por día.

La medición de TSH se realizó con el reactivo Cobas (Roche Diagnostics, 2009), que es un inmunoensayo por electroquimioluminiscencia, cuyo intervalo de detección de 0.005 a 100 mU/L. La medición de T4L se realizó con el reactivo Cobas (Roche Diagnostics, 2009), que es un inmunoensayo por electroquimioluminiscencia, con valor de referencia 0.9-1.7 ng/dL, con intervalo de detección de 0.23-7.77 ng/dL. Aquellos sujetos con valor de TSH mayor de 4.5 mU/L y con valor de T4L dentro del rango de referencia, fueron clasificados como HSC.

El calcio en arterias coronarias (CAC) se determinó utilizando un tomógrafo multidetector de 64 cortes (Somatom Sensation, Siemens, Erlanger, Alemania). Para la determinación de CAC mediante tomografía se utilizó el método de Agatston.<sup>42</sup> Se adquirieron imágenes de acuerdo al protocolo convencional, desde la carina hasta el margen inferior del corazón. Se reconstruyeron con grosor de 3 mm e intervalos de 3 mm, con un filtro b35f Kernel, y fueron analizados

utilizando software especializado para esta función (Calcium Scoring, Siemens, Alemania). Cada foco que excedió 130 unidades Hounsfield en un mínimo de 3 píxeles contiguos se sumó de acuerdo al protocolo de Agatson, y al sumar cada uno de estos puntajes se obtuvo el puntaje de CAC total.<sup>42</sup> Las imágenes fueron interpretadas por un médico radiólogo con amplia experiencia en este tipo de estudios.

Para definir hígado graso (HG) se utilizó el índice de atenuación hígado/bazo (IAH:B). Para calcularlo, con un solo corte tomográfico de 3 mm de espesor a nivel de T11-T12 o T12-L1, se analizaron al menos tres regiones de interés de 1 cm<sup>2</sup>, sobre el parénquima hepático y sobre el esplénico, y se obtuvo un promedio de ellas. El IAH:B menor de 1 fue utilizado para definir la presencia de HG.<sup>43</sup>

Para medir la grasa abdominal se realizó un solo corte tomográfico a nivel del espacio intervertebral L4-L5. Las áreas de las GAV y la GAS mediante un trazo manual siguiendo la pared muscular abdominal. Se cuantificaron la GAT y la GAV en cm<sup>2</sup>, y la GAS se calculó restando el área de la GAS de la GAT.<sup>44</sup>

El EC se planeó determinar utilizando células J774 de ratón (macrófagos). Las células J774 se mantienen en medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10% a 37°C y 7% de CO<sub>2</sub>. Se usan placas para cultivo celular de 24 pozos en las que colocan aproximadamente 280,000 células por pozo. Después de 24 hr de incubación el medio de crecimiento se reemplaza con RPMI-1640 suplementado al 1% con SFB, 0.5 mCi de colesterol marcado con tritio (1,2-<sup>3</sup>H-Colesterol) y 2 mcg de inhibidor de ACAT por ml. Al día siguiente las células se lavan con el mismo medio, se incuban durante 18 hr en presencia de 2 mcg de inhibidor de ACAT con y sin 0.3 mM de un análogo de AMPc para regular a la alta los receptores ABCA1. Al día siguiente se lavan las células y se incuban a 37°C durante 4 hr con suero total diluido al 2% o con HDL aisladas por ultracentrifugación y ajustando por fosfolípidos (100 ng/mL) o por la concentración de Apo A-1 (20 mg/mL). Se mide la radiactividad total que incorporaron las células y la radiactividad que se encontró en el medio después de 4 hr de incubarlas con la muestra. El eflujo por ABCA1 se determina como el porcentaje de colesterol marcado liberado por los macrófagos al medio de cultivo.<sup>45</sup> Los coeficientes de variación intra e interensayo son de 4.9% y 8.1% respectivamente.

El protocolo fue avalado por el Comité de Ética del Instituto, y todos los sujetos participantes firmaron un consentimiento informado.

### 3.4 Análisis Estadístico.

Las características generales se expresan como medias  $\pm$  desviación estándar, medianas (rango intercuartílico) o proporciones. La normalidad de las distribuciones se analizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación entre sujetos con HSC y aquellos con función tiroidea normal se realiza con t-student, U-Mann Whitney ó Chi cuadrado, según corresponda, al igual que la comparación entre sujetos con EAC y sin EAC. La media del porcentaje de eflujo de colesterol entre los tres grupos se planeaba comparar por medio de ANOVA o Kruskal-Wallis, según correspondiera. Los análisis de correlación se realizaron con las pruebas de Pearson o de Spearman. Para confirmar independencia en las asociaciones se realizaron análisis multivariados de regresión logística. Se utilizó el paquete estadístico Stata versión 12 (Data Analysis and Statistical Software, Stata Corp LP, Texas EE.UU.).

## **10.- Resultados.**

De los 1600 sujetos que se estudiaron inicialmente en el análisis, 813 (50.81%) correspondieron al género femenino y 787 (49.19%) al género masculino. La edad media de esta población fue de  $53.25 \pm 9.35$  años. De ellos, en 91 sujetos no fue posible establecer el estado tiroideo debido a discordancias en los valores de TSH y de T4L. Las prevalencias de función tiroidea anormal fueron de 16.25% para HSC, 2.25% para hipotiroidismo franco, de 1.38% para hipertiroidismo subclínico y de 0.38% para hipertiroidismo franco. En el Cuadro 2 se muestran las prevalencias de disfunción tiroidea por género. Se observa que la distribución fue significativamente diferente en ambos géneros.

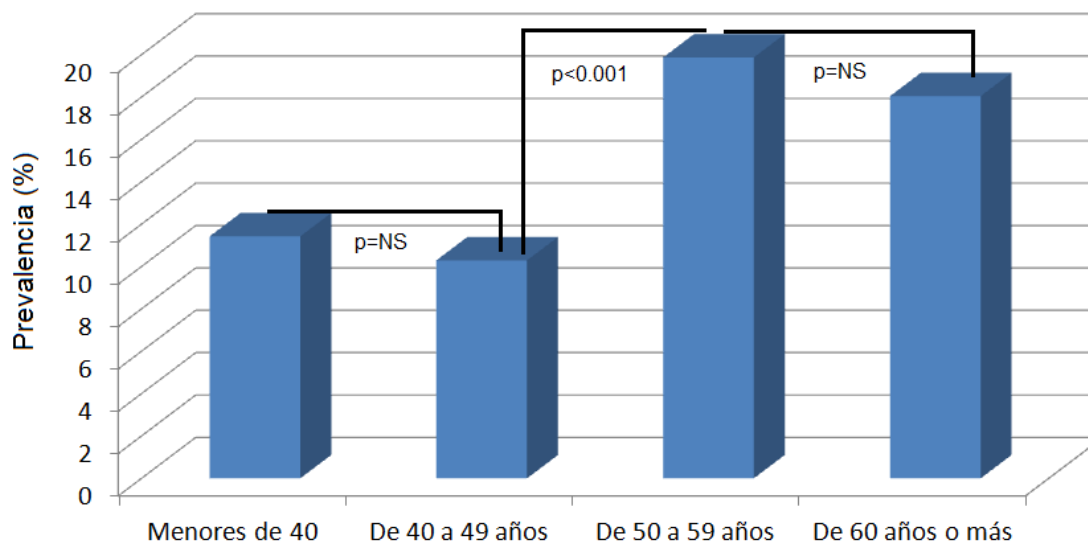
Cuadro 2. Porcentaje de individuos, según condición tiroidea de acuerdo al género (N=1600).

	Mujeres (%)	Hombres (%)
<b>Hipertiroidismo franco</b>	0.49	0.25
<b>Hipertiroidismo subclínico</b>	0.61	1.78
<b>Eutiroidismo</b>	68.51	79.92
<b>Hipotiroidismo subclínico</b>	21.03	11.30
<b>Hipotiroidismo franco</b>	3.93	0.76
<b>No clasificables</b>	5.41	5.97

$\chi^2 = 38.28, p < 0.0001$

En el análisis por grupos de edad, la prevalencia de HSC fue casi del doble en los sujetos de 50 años o más, comparados con los individuos de 49 años o menos, lo cual alcanzó significado estadístico (Figura 1). La población de menores de 40 años correspondió a 105 individuos, de 40 a 49 años a 437, de 50 a 59 años a 659, y de 60 años o más a 399 personas.

Figura 1. Prevalencia de Hipotiroidismo Subclínico por grupos de edad (N=1600).



En el Cuadro 3 se anota que la prevalencia de  $CAC \geq 1$  fue de 24.82% en el total de la población, siendo significativamente más alta en los hombres que en las mujeres. Al igual que en el caso

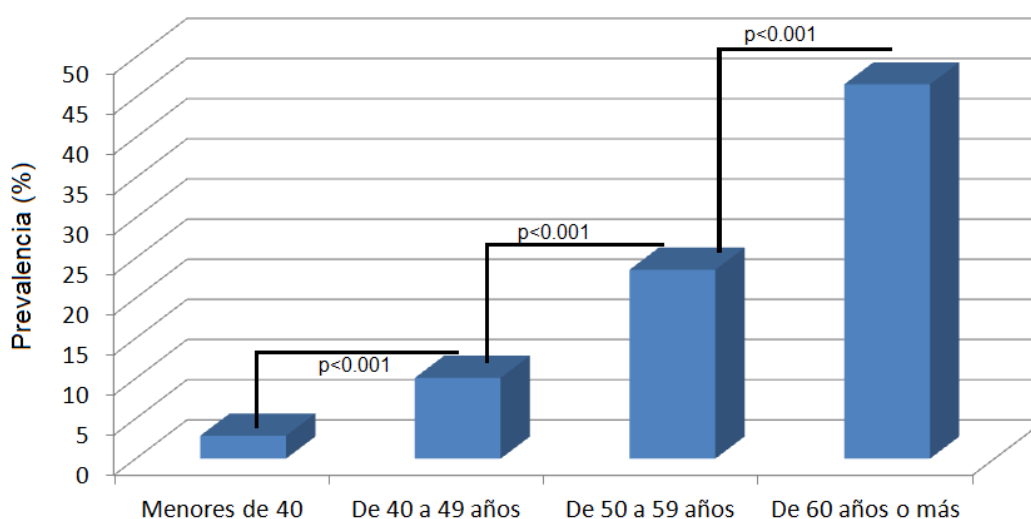
del HSC, la prevalencia de  $CAC \geq 1$  aumentó en forma progresiva con la edad, siendo de 2.85% en los menores de 40 años, y de 46.61% en los mayores de 60 años. Esta diferencia fue significativa (Figura 2).

**Cuadro 3.** Prevalencia de Calcificación Arterial Coronaria mayor o igual a 1 según el género (N=1600).

	Mujeres (%)	Hombres (%)
Puntaje de CAC <1	86.95	62.92
Puntaje de CAC $\geq 1$	13.05	37.08

$\chi^2 = 134.48, p < 0.0001$

**Figura 2.** Prevalencia de Calcificación Arterial Coronaria mayor o igual a 1 por grupos de edad (N=1600).



En el Cuadro 4 se exponen las diferencias entre aquellos individuos con  $CAC \geq 1$  y  $CAC < 1$ . Como era de esperarse, los FRC como DM, HAS y obesidad son significativamente más prevalentes en quienes tienen EAC subclínica. El tabaquismo, contrario a lo anticipado, fue más prevalente en aquellos sujetos sin  $CAC \geq 1$ , aunque no alcanzó un significado estadístico. En cuanto a los valores medios, solamente la insulina y la PCR no alcanzaron una concentración sérica significativamente más alta en aquellos individuos con  $CAC \geq 1$ , mientras que la ApoA tampoco presentó un valor significativamente más bajo. De manera interesante, y de particular relevancia para esta investigación, el valor de TSH no fue diferente en los dos grupos.

Cuadro 4. Características clínicas y bioquímicas de los sujetos con CAC $\geq$ 1 y CAC $<$ 1 (N=1600).

	CAC $<$ 1 (N=1203)	CAC $\geq$ 1 (N=397)	
Variable	Valor	Valor	P
Edad (años)	52 [46-57]	59 [53-65]	<b>&lt;0.001</b>
HAS (%)	19.5	39.5	<b>&lt;0.001</b>
DM (%)	10.1	22.6	<b>&lt;0.001</b>
Tabaquismo (%)	22.4	20.4	0.257
TA sistólica (mmHg)	113 [104-123]	123 [111-137]	<b>&lt;0.001</b>
TA diastólica (mmHg)	71 [66-77]	76 [69-82]	<b>&lt;0.001</b>
IMC $>$ 30 (kg/m <sup>2</sup> )	29.7%	32.1%	0.150
Cintura (cm)	93.7 +/- 11.7	97.7 +/- 11.3	<b>&lt;0.001</b>
Glucosa (mg/dL)	89 [83-97]	94 [87-106]	<b>0.001</b>
Ácido úrico (mg/dL)	5.3 [4.3-6.4]	5.9 [4.8-7.0]	<b>&lt;0.001</b>
Creatinina (mg/dL)	0.82 [0.7-0.96]	0.92 [0.81-0.99]	<b>&lt;0.001</b>
Colesterol total (mg/dL)	190 [166-211]	198 [170-221]	<b>0.009</b>
Triglicéridos (mg/dL)	142 [108-197]	159 [118-205]	<b>0.006</b>
C-HDL (mg/dL)	48 [36-56]	45 [41-53]	<b>&lt;0.001</b>
C-LDL (mg/dL)	115 [96-134]	124 [102-145]	<b>&lt;0.001</b>
Apo A (mg/dL)	135 [116-157]	133 [114-157]	0.688
Apo B (mg/dL)	91 [71-110]	97 [80-119]	<b>0.002</b>
Insulina (mcU/mL)	17.0 [12.4-23.2]	18.1 [12.9-24.7]	0.151
PCR (mg/L)	1.6 [0.8-3.4]	1.7 [0.8-3.7]	0.551
TSH (mU/mL)	3.62 +/- 5.23	3.49 +/- 3.43	0.251

Valores expresados en medianas [rango intercuartílico], y media +/- desviación estándar, excepto HAS, DM y tabaquismo que son porcentajes.

En el Cuadro 5 se enlistan las características clínicas, bioquímicas y tomográficas de los grupos con función tiroidea normal y con HSC (no se incluyeron ya otras categorías de estatus tiroideo). La edad, el IMC, las concentraciones de insulina, el índice HOMA-RI, la GAS, la GAT y ALP, fueron significativamente más altas en el grupo con HSC. De las variables lipídicas, el CT y la Apo A-1 se encontraron también más altas en el grupo con baja función tiroidea pero las diferencias no alcanzaron significado estadístico. La TSH se encontró en valores más altos y la T4L con valores más bajos (pero dentro del rango de normalidad) en los participantes con HSC.. La hipercolesterolemia y el HOMA-RI elevado se observaron con mayor frecuencia en el grupo con disfunción tiroidea (Cuadro 6), pero el significado estadístico fue marginal. Estos participantes también mostraron una prevalencia menor de tabaquismo actual. Se hace notar que

la calcificación coronaria, analizada como puntaje promedio o como  $CAC \geq 1$ , no mostró diferencias entre los dos grupos.

Cuadro 5. Características clínicas, bioquímicas y tomográficas de los sujetos con función tiroidea normal y de aquellos con HSC (N=1439).

	<b>Eutiroidismo (N=1179)</b>	<b>HSC (N=260)</b>	
<b>Variable</b>	<b>Valor</b>	<b>Valor</b>	<b>P</b>
Edad (años)	52.65 ± 9.35	55.28 ± 8.68	<b>&lt;0.0001</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.76 [25.42-30.93]	28.73 [25.58-31.30]	<b>0.030</b>
Cintura (cm)	94.73 ± 11.75	95.17 ± 11.20	0.394
Frecuencia Cardíaca (lpm)	65.5 [60-71]	64.5 [59-73]	0.272
TA sistólica (mmHg)	114 [105-125]	116 [105.5-127.5]	0.293
TA diastólica (mmHg)	71.5 [66-77.5]	72 [66.5-77.5]	0.874
Ácido úrico (mg/dL)	5.52 [4.52-6.62]	5.45 [4.5-6.5]	0.417
Glucosa (mg/dL)	91 [84-99]	90 [84-99]	0.916
Creatinina (mg/dL)	0.84 [0.7-0.99]	0.84 [0.71-0.98]	0.981
Colesterol total (mg/dL)	190.2 [166-211]	192.15 [170-221.5]	0.074
Triglicéridos (mg/dL)	146.05 [109.5-200.1]	152.7 [114.2-210.05]	0.171
C-HDL (mg/dL)	43.7 [36.1-54]	45.7 [36.4-54.2]	0.176
CT/C-HDL	4.4 [3.5-5.5]	4.3 [3.3-5.8]	0.754
C-LDL (mg/dL)	117.04 [96.25-135.94]	118.46 [96.57-140.24]	0.457
Apo A-1 (mg/dL)	132.85 [114.45-155.5]	135.9 [118.6-157.8]	0.088
Apo B (mg/dL)	94 [77-114]	95 [78-118]	0.478
Índice ApoB/ApoA	0.71 [0.55-0.89]	0.73 [0.55-0.88]	0.692
Insulina (mcU/mL)*	17.01 [12.26-23.08]	17.58 [13.74-25.11]	<b>0.023</b>
HOMA-RI	3.83 [2.63-5.71]	4.15 [2.88-6.15]	<b>0.042</b>
PCR (mg/L)	1.52 [0.77-3.21]	1.61 [0.95-3.7]	0.176
GAV (cm <sup>2</sup> )	149 [108-194]	151 [113-193.5]	0.569
GAS (cm <sup>2</sup> )	279.5 [210-351]	298 [229.5-389]	<b>0.027</b>
GAT (cm <sup>2</sup> )	432 [344-537]	435 [363-568]	<b>0.042</b>
Índice de atenuación H/B	1.09 [0.90-1.20]	1.10 [0.94-1.23]	0.276
Actividad física total	7.87 [7.0-8.62]	8.0 [7.12-8.9]	0.058
Puntaje de CAC (UA)	0.0 [0.0-0.3]	0.0 [0.0-1.35]	0.552
TSH (mU/L)	2.32 [1.7-3.1]	5.90 [5.01-7.91]	<b>&lt;0.0001</b>
T4 L (pmol/L)	1.22 [1.12-1.32]	1.15 [1.05-1.27]	<b>&lt;0.0001</b>
ALT (U/L)	24 [18-34]	22 [18.5-32]	0.116

AST (U/L)	24 [21-30]	25 [21-30]	0.789
ALP (U/L)	80 [66-94]	85 [69-101]	<b>0.011</b>
GGT (U/L)	29 [19-44]	27 [19-40]	0.449

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar y mediana [rango intercuartílico].

\* La insulinemia se determinó solamente en 937 sujetos.

Cuadro 6. Prevalencias de diferentes factores de riesgo cardiovascular en sujetos con función tiroidea normal y con Hipotiroidismo Subclínico (N=1439).

	Eutiroidismo (N=1179)	HSC (N=260)	
Variable	Valor (%)	Valor (%)	P
Obesidad (cintura)	75.57	75.10	0.873
Obesidad (por IMC)	29.86	33.98	0.217
Sobrepeso (por IMC)	47.92	47.88	0.244
Hipertensión arterial	25.02	25.10	0.980
Hipertrigliceridemia	47.62	51.15	0.302
Tabaquismo actual	23.07	16.92	<b>0.030</b>
Hipoalfalipoproteinemia	51.31	50.97	0.919
Hipercolesterolemia	37.4	43.46	0.069
Colesterol LDL >130 mg/dL	31.44	36.58	0.111
Colesterol no HDL >160 mg/dL	30.36	34.36	0.208
Glucosa >100 mg/dL	23.75	23.85	0.976
Diabetes mellitus	12.38	15.0	0.254
Hiperinsulinemia*	56.43	58.0	0.684
HOMA-RI elevado	59.3	65.75	0.057
PCR elevada	27.0	29.07	0.555
CAC $\geq 1$	23.74	25.39	0.576
Hígado graso	33.68	30.16	0.282
Síndrome metabólico	41.56	44.19	0.439

\* Prevalencia de hiperinsulinemia en los 937 individuos en que se contaba con el dato.

Para determinar la independencia de las asociaciones observadas entre CAC y otras variables se utilizó una regresión logística multivariada. En un primer modelo las variables independientes fueron edad, género e HSC, y la dependiente la presencia de CAC $\geq 1$ . La razón de momios (RM) para HSC fue de 1.150 [95% IC de 0.851-1.556] con valor de p de 0.364. En el siguiente modelo se incluyeron TSH, T4L, presencia de HSC, edad y género. En el Cuadro 7 se muestra que la TSH (RM de 1.07 [1.00-1.14]), la edad (RM 1.11 [1.09-1.13]) y el género masculino (RM 5.91 [4.34-8.06]) se asociaron en forma independiente con la presencia de CAC $\geq 1$ .



Cuadro 7. Regresión logística multivariada para calcificación arterial coronaria mayor o igual a 1.

<b>CAC≥1</b>	<b>RM</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>z</b>	<b>P&gt;z</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>
<b>HSC</b>	0.731436	0.1803273	-1.27	0.205	0.4511512 - 1.185852
<b>TSH</b>	1.070998	0.0345858	2.12	<b>0.034</b>	1.005312 - 1.140976
<b>T4L</b>	0.5316172	0.2604286	-1.29	0.197	0.2035226 - 1.388627
<b>Edad</b>	1.118953	0.009943	12.65	<b>&lt;0.000</b>	1.099633 - 1.138611
<b>Género masculino</b>	5.917593	0.9352728	11.25	<b>&lt;0.000</b>	4.341232 - 8.06635

*Log likelihood = -605.18067, LR  $\chi^2 = 340.57$ , probabilidad  $\chi^2 = <0.000$ .*

Considerando que de las variables relacionadas con la función tiroidea, únicamente la TSH se asoció con CAC≥1, en el siguiente análisis se incluyó esta variable junto con edad y género masculino. En este modelo en el que se agregaron otros FRC se observó que la TSH perdió su significado (RM 1.0 [95% IC 0.97-1.03]), mientras que edad (RM 1.11 [95% IC 1.10-1.13]) y género (RM 5.67 [95% IC 4.27-7.55]) continuaron siendo significativas.

Para evaluar la participación de otras variables asociadas significativamente con CAC≥1 en la correlación bivariada, los siguientes modelos, además de TSH, edad y género masculino, incluyeron las variables: cintura, creatinina, TAS, insulina, C-LDL, C-HDL, ALT, AST, ALP, IMC, ApoA, ApoB, actividad física total, TG, glucosa, HOMA-RI y PCR. Los resultados mostraron la asociación consistente de la edad y el género masculino con CAC≥1, pero se confirmó que la TSH no tiene asociación independiente. Adicionalmente, se encontró que la TAS, el C-LDL, el IMC y la Apo B se asocian en forma independiente con la CAC. Los resultados de los análisis con los diferentes modelos multivariados utilizados llevaron a la conclusión de que el HSC, la T4L y la TSH, no tienen asociación independiente con la presencia de CAC≥1.

En el análisis estadístico de este trabajo se incluyó también un modelo para estudiar los factores asociados a la presencia de HSC. El análisis de regresión logística multivariada mostrado en el Cuadro 8, reveló asociación directa e independiente del HSC con la edad, e inversa con el género masculino. Los lípidos, las enzimas hepáticas, la presencia de HG o de CAC≥1, no mostraron asociaciones con la disfunción tiroidea.

Cuadro 8. Modelo de regresión logística para factores asociados al HSC.

HSC	RM	Error Estándar	z	P>z	95% Intervalo de Confianza
Edad	1.033162	0.011288	2.99	<b>0.003</b>	1.011273 - 1.055524
C-LDL	1.001642	0.0028515	0.58	0.565	0.9960683 - 1.007246
Creatinina	3.627034	1.970266	2.37	<b>0.018</b>	1.250733 - 10.51813
C-HDL	1.00613	0.0079422	0.77	0.439	0.9906837 - 1.021818
Triglicéridos	1.001133	0.001109	1.02	0.307	0.9989622 - 1.003309
AST	1.005529	0.0081756	0.68	0.498	0.9896318 - 1.021681
ALP	1.000577	0.0038731	0.15	0.882	0.9930143 - 1.008197
GAT	1.000951	0.0006613	1.44	0.151	0.9996555 - 1.002248
Género masculino	0.4225849	0.108364	-3.36	<b>0.001</b>	0.2556462 - 0.6985359
Hígado Graso	0.910821	0.19534	-0.44	0.663	0.5982454 - 1.386713
CAC $\geq$ 1	1.176608	0.282964	0.68	0.499	0.7343872 - 1.885117

Log likelihood = -404.72643, LR  $\chi^2$  = 36.81, probabilidad  $\chi^2$  = 0.0001.

Los análisis descritos se repitieron después de eliminar a los individuos con diabetes mellitus y aquellos con uso de beta bloqueadores, por el posible efecto confusor que pudieran estar condicionando. Los resultados no mostraron cambios significativos.

Hígado Graso. Durante el desarrollo del presente trabajo aparecieron publicados algunos trabajos que mostraron estrecha asociación entre el HSC y el hígado graso.<sup>46-47</sup> Esta información, aunada al conocimiento de que la resistencia a la insulina es una característica clave del HG, y a la observación de que la insulinemia y el HOMA-RI elevado fueron significativamente más altos en nuestros sujetos con HSC, motivó el interés en explorar la participación del HG en las asociaciones del HSC con FRC, y con la aterosclerosis subclínica. En un primer análisis (en que se incluyeron todos los individuos en quienes se contaba con la determinación de insulina), los participantes, tanto con función tiroidea normal como aquellos con HSC, fueron estratificados con base a la presencia o ausencia de HG. Los resultados (Cuadro 9) mostraron que en comparación con los grupos EU e HSC sin HG, el grupo de HSC con HG tuvo un perfil de riesgo más adverso, caracterizado por mayor exceso de peso, más obesidad abdominal y acúmulo de GAV, así como un número más alto de anomalías metabólicas.

Cuadro 9. Características clínicas y bioquímicas de sujetos eutiroides y con hipotiroidismo subclínico estratificados de acuerdo a la presencia de hígado graso.

	Eutiroidismo			HSC		
	Hígado graso(-) (n=534)	Hígado graso(+) (n=239)	p	Hígado graso(-) (n= 114)	Hígado graso(+) (n= 50)	p
Edad (años)	52 ± 9.6	51.80 ± 8.15	0.426	56.1 ± 8.4**	53.24 ± 8.25	0.070
Género femenino	55.3%	44.7%	<b>0.013</b>	65.6%	59.5%	0.423
IMC (kg /m <sup>2</sup> )	27.3 ± 4.3	30.0 ± 4.16	<b>&lt;0.01</b>	27.6 ± 3.9	30.5 ± 3.9**	<b>&lt;0.001</b>
Cintura (cm)	91.5 ± 12	99.4 ± 12	<b>&lt;0.01</b>	91.5 ± 10	99.5 ± 10**	<b>&lt;0.001</b>
GAV (cm <sup>2</sup> )	126 (89-170)	173 (145-220)	<b>&lt;0.01</b>	133(101-174)	178 (130-233)**	<b>&lt;0.001</b>
TAS (mmHg)	115 ± 18	118 ± 15	<b>0.025</b>	116 ± 19	120 ± 17	0.106
TAD (mmHg)	71 ± 9.4	73.8 ± 10	<b>&lt;0.01</b>	71.0 ± 10	73.13 ± 9.7	0.091
CT (mg/dl)	192 ± 37	192 ± 39	0.911	195 ± 34	204 ± 40	0.233
TG (mg /dl)	128 (98-177)	159 (121-219)	<b>&lt;0.01</b>	128 (101-175)	164 (141-259)**	<b>&lt;0.001</b>
C-HDL (mg /dl)	46.4 (38-57)	39.9 (34-49)	<b>&lt;0.01</b>	50.2 (42-58)	41.2 (35-49)*	<b>&lt;0.001</b>
Col. No-HDL (mg /dl)	140 (120-163)	148 (125-168)	0.562	139 (123-162)	165 (127-187)**	<b>&lt;0.001</b>
CT/HDL-C	4.0 (3.3-4.9)	4.7 (3.9-5.6)	<b>&lt;0.01</b>	3.8 (3.2-4.9)	4.6 (4.0-6.0)**	<b>&lt;0.001</b>
Glucosa (mg /dl)	89 ± 9	94 ± 10	<b>&lt;0.01</b>	88 ± 9	96 ± 11**	<b>&lt;0.001</b>
Insulina (µU/ml)	14.7 (11-20)	22.6 (18-29)	<b>&lt;0.01</b>	14.9 (11-19)	25.7 (17-28)**	<b>&lt;0.001</b>
HOMA-RI	3.1 (2.2-4.5)	5.2 (3.8-7.0)	<b>&lt;0.01</b>	3.0 (2.4-4.2)	5.6 (4.4-6.9)**	<b>&lt;0.001</b>
PCR (mg /l)	1.35 (0.7-2.7)	2.02 (1.1-4.0)	<b>&lt;0.01</b>	1.24 (0.7-2.4)	3.54 (1.5-5.5)**	<b>&lt;0.001</b>
ALT (U/l)	21 (16-27)	34 (24-51)	<b>&lt;0.01</b>	20 (15-27)	29.5 (25.5-42)**	<b>&lt;0.001</b>
AST (U/l)	23 (19-28)	29 (24-38)	<b>&lt;0.01</b>	25 (20-29)	28.5 (24.5-36)**	<b>&lt;0.001</b>
TSH (mU/l)	2.3 (1.7-3.0)	2.2 (1.7-2.9)	0.914	6.18 (5.1-8.3)**	5.9 (5.0-8.1)**	0.628
T4L (pmol/l)	1.2 (1.1-1.3)	1.19 (1.0-1.3)	0.865	1.14 (1.04-1.2)**	1.14 (1.1-1.2)*	0.899
Alcohol (g/día)	1.0 (0.38-4.7)	1.58 (0.48-4.4)	0.347	0.38 (0.38-1.9)*	0.96 (0.38-4.7)	0.248

Valores expresados como media ± desviación estándar y mediana (rango intercuartílico).

\*  $p < 0.05$  vs EU con HG(-).

\*\*  $p < 0.01$  vs EU con HG(-).

Para determinar si la asociación de HSC(HG+) con resistencia a la insulina era independiente, se realizaron modelos de regresión logística multivariada. Se utilizaron también modelos similares tomando como variables dependientes  $CAC \geq 1$  y SM. En el Cuadro 10 se muestra que en el análisis ajustado por edad, género e IMC, los sujetos EU(HG+) y los sujetos HSC(HG+) tuvieron probabilidades significativamente más altas de presentar SM y resistencia a la insulina (determinada por HOMA-RI elevado) que el grupo de referencia. Después de un ajuste adicional por GAV, PCR y T4L, las RM disminuyeron, pero permanecieron estadísticamente significativas. Respecto a la asociación con  $CAC \geq 1$ , únicamente el grupo HSC(HG+) mostró relación con

significado estadístico en los dos modelos utilizados. El grupo de HSC(HG-) no mostró asociaciones con las variables analizadas.

**Cuadro 10.** Asociaciones multivariadas de los grupos de eutiroidismo y de hipotiroidismo subclínico con síndrome metabólico, HOMA-RI y calcificación arterial coronaria mayor de 1, según la presencia o ausencia de hígado graso.

	Síndrome Metabólico	HOMA-RI elevado	CAC $\geq$ 1
<b>Modelo 1</b>			
EU con HG-	Referencia	Referencia	Referencia
EU con HG+	<b>1.79 (1.24-2.60)</b>	<b>4.34 (2.79-6.80)</b>	0.87 (0.54-1.41)
HSC con HG-	0.92 (0.55-1.54)	1.01 (0.62-1.65)	0.78 (0.42-1.48)
HSC con HG+	<b>3.28 (1.56-6.94)</b>	<b>7.23 (2.40-21.83)</b>	<b>2.75 (1.18-6.42)</b>
<b>Modelo 2</b>			
EU con HG-	Referencia	Referencia	Referencia
EU con HG+	<b>1.58 (1.08-2.31)</b>	<b>3.49 (2.20-5.55)</b>	0.83 (0.51-1.35)
HSC con HG-	0.88 (0.52-1.45)	0.91 (0.54-1.53)	0.72 (0.37-1.37)
HSC con HG+	<b>2.95 (1.38-6.30)</b>	<b>5.24 (1.72-15.96)</b>	<b>2.47 (1.05-5.81)</b>

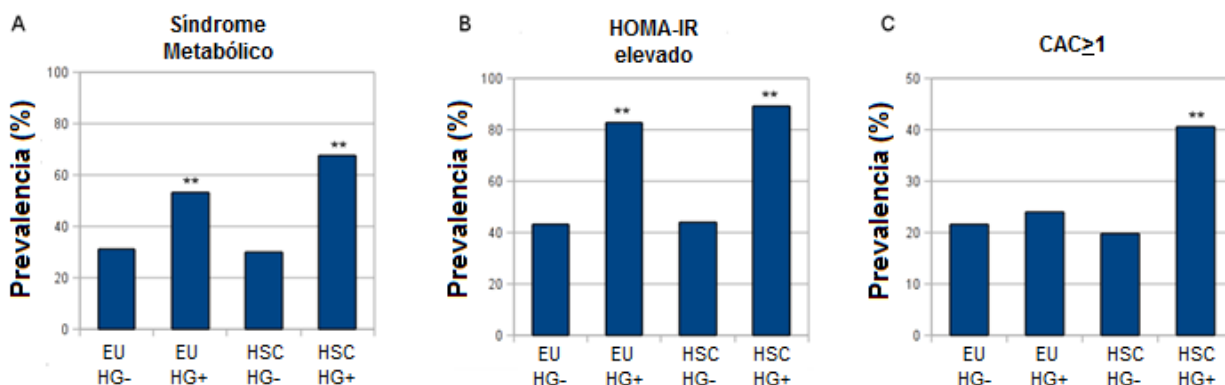
Valores expresados como RM (intervalo de confianza).

Modelo 1: Ajustado por edad, género e IMC.

Modelo 2: Ajustado por edad, género, IMC, GAV, PCR, T4L, y además por síndrome metabólico en el caso de CAC $\geq$ 1.

Las prevalencias de SM, HOMA-RI elevado y de CAC  $\geq$ 1 en los participantes eutiroides y en aquellos con HSC, de acuerdo a la presencia de HG, se muestran en la Figura 4. Comparados con el grupo EU(HG-), los sujetos de los grupos EU(HG+) y de HSC(HG+) tuvieron prevalencias significativamente más altas de SM y de HOMA-RI elevado. Únicamente en el grupo de HSC(HG+) la prevalencia de CAC  $\geq$ 1 fue significativamente más alta en comparación con el grupo de referencia.

Figura 4. Prevalencias de anomalías metabólicas y de calcificación arterial coronaria mayor o igual a 1 en sujetos eutiroides y con hipotiroidismo subclínico según presencia de hígado graso.



\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$  vs EU HG(-).

## 11.- Discusión

Los resultados del presente estudio muestran que los sujetos con HSC tienen pocas diferencias en las prevalencias de FRC al ser comparados con los sujetos que cursan con función tiroidea normal. Además, señalaron que no existe asociación independiente de las concentraciones en suero de TSH y de T4L o de la presencia misma del HSC con la CAC. Sin embargo, el hallazgo más importante fue que el grupo de sujetos con HSC e HG presenta múltiples anomalías metabólicas, que le confieren alto riesgo de enfermedad cardiovascular. De hecho, este grupo mostró asociación con el SM, la resistencia a la insulina, y lo más importante, con la presencia de CAC $\geq$ 1, aun después de ajustar por factores confusores que incluyeron la GAV. Estos resultados sugieren que la presencia de HG ejerce importante influencia en la asociación del HSC con FRC y con la EAC misma.

La prevalencia de HSC en la población estudiada fue de 16.25%, que es más alta a la previamente informada en estudios realizados en nuestro país.<sup>6-7</sup> Las posibles explicaciones de las discrepancias incluyen diferencias en las características de la población estudiada, la metodología empleada y los puntos de corte utilizados para definir el HSC. De manera similar a lo reportado en estudios previos,<sup>1, 3-4, 6</sup> las prevalencias de HSC y de hipotiroidismo franco fueron más altas en el género femenino y en los sujetos mayores de 50 años. Por otra parte, la prevalencia de CAC $\geq$ 1 fue de 24.82%, con una diferencia significativa entre ambos géneros,

pues en varones fue de 37.08%, mientras que en las mujeres fue de 13.05%. Además del género masculino, la edad y todos los FRC reconocidos fueron más prevalentes en estos sujetos.

Estudios previos han informado asociaciones del HSC con valores altos de glucosa, triglicéridos, colesterol total, insulina, resistencia a la insulina, IMC, y PCR,<sup>24-25, 48-50</sup> pero estos hallazgos no han sido consistentes en todas las investigaciones.<sup>17-18</sup> En el presente estudio se encontraron valores medios no ajustados significativamente más altos de IMC, insulina, HOMA-RI, grasa abdominal subcutánea, grasa abdominal total y fosfatasa alcalina, en los sujetos con HSC comparados con los EU. Sin embargo, los valores elevados de estas variables no tuvieron prevalencias más altas en el grupo de HSC. También las prevalencias de  $CAC \geq 1$ , de SM, y de HG fueron similares en ambos grupos. Con base en estos resultados, es razonable sugerir que no existe asociación independiente entre el HSC y la calcificación coronaria, ni entre las concentraciones de TSH y de T4L con  $CAC \geq 1$ , lo cual fue confirmado por los diferentes modelos de análisis multivariado ajustados por confusores.

Considerando la información derivada de literatura reciente sobre la asociación de HSC con el HG,<sup>46-47</sup> los sujetos eutiroides y los sujetos con HSC, fueron estratificados de acuerdo a la presencia de HG. En el análisis de estos grupos, los sujetos con HSC(HG+) mostraron amplia variedad de anormalidades antropométricas, bioquímicas y tomográficas en comparación con los grupos EU(HG-) e HSC(HG-). Destacaron el exceso de peso, la obesidad abdominal, la dislipidemia, la resistencia a la insulina y la elevación de PCR. Los sujetos EU(HG+) mostraron valores muy similares a los del grupo HSC(HG+) en todas las variables analizadas, excepto en las concentraciones de TSH, PCR y colesterol no-HDL. Para estudiar mejor las asociaciones observadas, se utilizaron análisis multivariados de regresión logística para determinar la independencia de las relaciones del HSC HG+ con el SM, el índice HOMA-RI elevado y el  $CAC \geq 1$ . Se encontró que la presencia de HG en sujetos con HSC aumenta significativamente la probabilidad de presentar cualquiera de los tres desenlaces. Estas asociaciones fueron independientes de edad, género, IMC, GAV, PCR y T4L. Para el caso específico de  $CAC \geq 1$ , los sujetos con HSC sin HG presentaron una RM de 0.72, pero aquellos con HSC e HG presentaron RM de 2.47.

Este trabajo es el primero en describir estos novedosos resultados. Aunque la asociación de HSC con HG ha sido demostrada, el carácter transversal de los estudios no ha permitido aclarar si el trastorno tiroideo favorece el desarrollo de HG, o si, por el contrario, el exceso de grasa intrahepática conduce a la disfunción tiroidea. Independientemente de la dirección en la causalidad, los resultados de este estudio destacan la importancia de la asociación como

condición proaterogénica y precursora de eventos cardiovasculares. Estos resultados además, pueden ser de utilidad para explicar la asociación del HSC con la EAC observada en algunos estudios, y los informes controversiales sobre la asociación del HSC con los diferentes FRC. Es decir, es posible que las diferentes prevalencias de HG en los diversos estudios sean la causa de las discrepancias que se han publicado.

Este estudio tiene varias limitaciones. Al igual que en todos los estudios transversales no es posible determinar causalidad, sino únicamente la presencia de asociaciones. Otra limitación potencial es la inclusión no aleatoria de los participantes en el estudio. Por lo tanto, la prevalencia observada, puede no ser representativa de la real. Una tercera limitación es que la población con HSC e HG es solamente de 50 individuos, por lo que es necesario que las asociaciones observadas se confirmen en estudios con muestras mayores.

Estos resultados se presentaron en el IV Coloquio de Investigación del Programa de Maestría y Doctorado. Por no haberse observado asociación independiente de HSC con  $CAC \geq 1$ , se propuso realizar un cambio en el diseño original. Considerando que los hallazgos parecen novedosos y relevantes, se planteó llevar a cabo la medición de EC en sujetos con HSC e HG, y tomar como controles a sujetos con HSC sin HG, y a sujetos EU sin HG, ya que de acuerdo a la información que obtuvimos, medir el EC de la forma originalmente planteada, muy probablemente conduciría a resultados negativos. Sin embargo, a pesar de que el Comité de Seguimiento estuvo de acuerdo en que la medición del EC como estaba originalmente considerada resultaría poco útil, nuestra petición no fue aceptada, y se concluyó que los resultados obtenidos hasta el momento eran suficientes para realizar el proceso de titulación de Maestría. El Comité sugirió realizar la medición de EC con los cambios propuestos pero en un estudio de investigación diferente.

## **12.- Conclusión.**

Los resultados de este estudio muestran que el HSC, el cual se encontró con una mayor prevalencia que en otras investigaciones, no se relaciona independientemente con la presencia de EAC, definida por la presencia de  $CAC \geq 1$ , por lo que no es recomendable proceder a la medición del EC en estos individuos. Sin embargo, el hallazgo de que la presencia de HG en sujetos con HSC incrementa significativamente las asociaciones con diversos FRC, y con  $CAC \geq 1$ , destaca la importancia de continuar esta línea de investigación.



### 13.- Referencias bibliográficas

1. Weiss I, Bloomgarden N, Frishman W. Subclinical hypothyroidism and cardiovascular risk. *Cardiol Rev* 2011;19:291-9.
2. Ochs N, Auer R, Bauer DC, Nanchen D, Gussekloo J, Cornuz J, et.al. Meta-analysis: Subclinical thyroid dysfunction and the risk for coronary heart disease and mortality. *Ann Int Med* 2008;148:832-45.
3. Cooper D, Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet* 2012;379:1142-54.
4. Fatourechi V. Subclinical hypothyroidism: An update for primary care physicians. *Mayo Clin Proc* 2009;84:65-71.
5. Navarro A. Ultrasonograma tiroideo en una población abierta de individuos asintomáticos de la Ciudad de México. Tesis para obtener el grado de especialista en Medicina Interna, 2009. No publicado (disponible en la Biblioteca Central de la Universidad Nacional Autónoma de México y en la Biblioteca del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán").
6. Sanchez LM, Barquera S, Campos I, Garcia E, Arellano S, González A, et. al. Concentraciones séricas de TSH en niños, adolescentes y adultos mexicanos. Resultados ENSANUT 2006. *Boletín Instituto Nacional de Salud Pública* 2012.
7. Garduño-García J, Alvirde-García U, López-Carrasco G, Padilla Mendoza M, Mehta R, Arellano-Campos O, et. al. TSH and free thyroxine concentrations are associated with differing metabolic markers in euthyroid subjects. *Eur J Endocrinol* 2010;163:273–8.
8. Rodondi N, den Elzen W, Bauer D, Cappola A, Razvi S. Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality. *JAMA* 2010;304:1365-74.
9. Duntas L, Biondi B. New insights into subclinical hypothyroidism and cardiovascular risk. *Sem Thromb Hemost* 2011;37:27-33. *Sem Thromb & Hemat.* 2010;37:27-33.
10. McQuade C, Skugor M, Brennan D, Hoar B, Stevenson C. Hypothyroidism and moderate subclinical hypothyroidism are associated with increased all-cause mortality independent of coronary heart disease risk factors: A preCIS Database Study. *Thyroid.* 2011;21:837-44.
11. Singh S, Duggal J, Molnar J, Maldonado F, Barsano CP, Arora R. Impact of subclinical thyroid disorders on coronary heart disease, cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis. *Int J Cardiol* 2008;125:41-8.
12. Haentjens P, Van Meerhaeghe A, Poppe K, Velkeniers B. Subclinical thyroid dysfunction and mortality: an estimate of relative and absolute excess all-cause mortality based on time-to-event data from cohort studies. *Eur J Endocrinol* 2008;159:329-41 *Eur J Endocrinol.* 2008;159(3):329-41.
13. Razvi S, Shaakor A, Vanderpump M, Weaver JU, Pearce SH. The influence of age on the relationship between subclinical hypothyroidism and ischemic heart disease: A metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2998-3007.

14. Park Y, Lee Y, Choi S, Chun E, Jang H, Chang H. Impact of subclinical hypothyroidism on the coronary artery disease in apparently healthy subjects. *Eur J Endocrinol*. 2011;165:115-21.
15. Hak E, Pols H, Visser T, Drexhage H, Hofman A, Witteman J. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: The Rotterdam study. *Ann Int Med* 2000;132:270-8.
16. Miura S, Iitaka M, Suzuki S. Decrease in serum level of thyroid hormone in patients with coronary heart disease. *Endocrine* 1996;43:657-63.
17. Canaris G, Manowitz N, Mayor G, Ridgway C. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Int Med* 2000;160:526-34.
18. Pierce EN. Update in lipid alterations in subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:326-33.
19. Stocker R, Keany J. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-478.
20. Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2003;83:1069-112.
21. Ittermann T, Baumesteir S, Völzke H, Wasner C, Schminke U, Wallaschofski H, et. al. Are serum TSH levels associated with oxidized low-density lipoprotein? Results from the study of health in Pomerania. *Clin Endocrinol* 2012;76:526-32.
22. Franco M, Chávez E, Pérez-Méndez O. Pleiotropic effects of thyroid hormones: Learning from hypothyroidism. *J Thyroid Res* 2011:1-17.
23. Kowlaska I, Boraski J, Nikolauk A, Buidlewski T, Otziomek E, Görska M, et. al. Insulin sensitivity, plasma adiponectin and sICAM-1 concentrations in patients with subclinical hypothyroidism: response to levothyroxine therapy. *Endocrine* 2011;40:95-101.
24. Kvetry J, Heldgaard P, Bladbjerg E, Gram J. Subclinical hypothyroidism is associated with a low grade inflammation, increased triglyceride levels and predicts cardiovascular disease in males below 50 years. *Clin Endocrinol* 2004;61:232-8.
25. Tian L, Gao C, Liu J, Zhang X. Increased carotid arterial stiffness in subclinical hypothyroidism. *Eur J Int Med* 2010;21:560-3.
26. Linderman R, Romero L, Schade D, Wayne S, Baumgartner R, Garry P. Impact of subclinical hypothyroidism on serum total homocysteine concentrations, the prevalence of coronary heart disease (CHD), and CHD risk factors in the New Mexico elder health survey. *Thyroid* 2003;13:595-600.
27. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, Calogero AE. Endothelial dysfunction and subclinical hypothyroidism: A brief review. *J Endocrinol Invest* 2012;35:96-103.
28. Rader D. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006;116:3090–100.

29. Kontush A, Chapman M. High Density Lipoproteins, Structure, Metabolism, Function, and Therapeutics. 1<sup>st</sup> ed, New Jersey: Wiley & Sons Inc; 2012.
30. Vergeer M, Holleboom A, Kastelein J, and Kuivenhoven J. The HDL hypothesis: Does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? *J Lipid Res* 2010;51:2058-74.
31. Llera-Moya M, Drazul D, Asztalos B, Cuchel M, Rader D, Rothblat G. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:796-801.
32. Yancey PG, Bortnick A, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:712-9.
33. Khera A, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et. al. Cholesterol efflux capacity, high density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Eng J Med* 2011;364:127-34.
34. Schoeman C. Abnormal function of high-density lipoprotein is associated with poor disease control and an altered protein cargo in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2870-9.
35. Rajesh M, Rader D. Evaluación de la heterogeneidad y función de HDL por el laboratorio. *Clin Chem* 2008;54:788-800.
36. Tsompanidi E, Brinkmeier M, Fotiadou E, Giakoumi S, Kypreos K. HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;208:3-9.
37. Hernández-Avila M, Romieu I, Parra S, Hernández-Avila J, Madrigal H, Willett W. Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in Mexico City. *Salud Publica Mex* 1998;40:133-140.
38. Baecke JA, Frijters J. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr* 1982;36:936-42.
39. Sugiuchi H, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, Miyauchi K. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem* 1995;41:717-23.
40. De Long DM, Wood P, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol: The lipid research clinics prevalence study. *JAMA* 1986;256:2372-7.
41. Matthews DR, Rudenski A, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetology* 1985;28:412-9.
42. Agatston AS, Janowitz W, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:827-32.

43. McKimmie RL, Daniel K, Carr JJ, Bowden DW, Freedman BI, Register TC, et al. Hepatic steatosis and sub-clinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: The diabetes heart study. *Am J Gastroenterol* 2008;103:3029-35.
44. Kvist H, Sjöström L, Tylén U. Adipose tissue volume determinations in women by computed tomography: Technical considerations. *Int J Obesity* 1986;10:53-67.
45. Asztalos B, Collins D, Dallal G, Horvath K, Schaefer E, Rothblat G. Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2005;46:2246-53.
46. Pacifico L, Bonci E, Ferraro F, Andreoli G, Bascetta S, Chiesa C. Hepatic steatosis and thyroid function tests in overweight and obese children. *Int J Endocrinol* 2013;2013:1-8.
47. Chung G, Kim W, Yoon Yim J, Jung Park M, Jun Kim Y, Yoon J, et. al. Non-alcoholic fatty liver disease across the spectrum of hypothyroidism. *J Hepatol* 2012;57:150-6.
48. Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen L, Perrild H, Ovesen L, Jørgensen T. Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4019-24.
49. Maratou E, Hadjidalis D, Kollias A, Tsegka K, Peppas M, Alevizaki M, et. al. Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2009;160:785-90.
50. Cappola A, Friend L, Arnold A, Danese M, Kuller L, Burke G, et. al. Thyroid status, cardiovascular risk, and mortality in older adults. *JAMA* 2006;295:1033-41.