

Bioquímica y Patología Clínica



Instituciones
destacadas:
Red Hospitalaria
de la UBA



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de
América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)



Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina
y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

SUMARIO

- Pág. 10 **EDITORIAL: Los nuevos paradigmas de la educación y la Asociación Bioquímica Argentina**
Por Dr. Néstor Litwin
- Pág. 13 **Comparación metodológica de la interferencia por anticuerpos antitiroglobulina en la medición de tiroglobulina**
Astarita, G.; Kogovsek, N.; Mormandi, E.; Vazquez, A.; Abalovich, M.; Bernatené, D.; Anzil, O.; Otero, P.
- Pág. 19 **Acumulación de plata y alteraciones histológicas en riñón de ratas Wistar post-administración oral aguda de proteinato débil de plata**
Quiroga, P. N.; Piñeiro, A. E.; Perazzo Rossini, J. P.; López, C. M.; Roses, O. E.
- Pág. 28 **Condicionantes del aumento del riesgo cardiovascular en pacientes con síndrome de Cushing activo**
Boero, L.; Meroño, T.; Manavela, M.; Danilowicz, K.; Maidana, P.; Buttazzoni, M.; Menafra, M.; Gómez Rosso, L.; Brites, F.
- Pág. 37 **Cuantificación sérica de inmunoglobulinas y proteínas del sistema del complemento en algunas enfermedades crónicas no trasmisibles**
Bequer Mendoza, L. C.; Gómez Hernández, T.; Pérez de Alejo Rodríguez, L.; López Fundora, F.; Pérez de Alejo Rodríguez, M.; Hernández Moreno, V.; Salazar Torres, L.
- Pág. 43 **Dosaje de albúmina: densitometría vs verde de bromocresol. Análisis de diferencias por Bland y Altman como criterio de autovalidación**
Bovone, N. S.; Fuente, M. C.; Vommaro, F.
- Pág. 49 **CURSOS ABA 2012**

Bioquímica y Patología Clínica

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP {1096}

Buenos Aires - Argentina

Tel/ fax: 4384-7415 / Tel: 4381-2907

e-mail: info@aba-online.org.ar

www.aba-online.org.ar

Registro Nacional de Derechos de Autor Nº 034772

Publicación cuatrimestral

COMISIÓN DE REVISTA

Director

Dr. Fernando Brites

Secretaría Científica

Dra. María Laura D'Ambrosio

Secretarios Administrativos

Srta. María Laura Carballo

Sr. Jorge Signorelli

Comité Editorial

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Isabel Desimone

Dr. Jaime Kovensky

Dr. Eduardo Chaler

Correctora de Estilo

Mg. Amalia Dellamea

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA - Fundada el 3 de septiembre de 1934

COMISIÓN DIRECTIVA

Presidente: Dr. Alberto Villagra

Vicepresidente: Dra. María Ruggiero

Secretario: Dr. Anibal Bagnarelli

Tesorero: Dra. Isabel Desimone

1º Vocal Titular: Dra. Graciela Astarita

2º Vocal Titular: Dra. María José Rial

3º Vocal Titular: Dra. Patricia Otero

1º Vocal Suplente: Dra. Silvia González

2º Vocal Suplente: Dra. Viviana Osta

3º Vocal Suplente: Dr. Orlando Gabriel Carballo

COMISIÓN REVISORA DE CUENTAS

Titular 1º: Dr. Mario Eposto

Titular 2º: Dr. Abel Pallares

Titular 3º: Dra. Graciela Peluffo

Suplente 1ª: Dra. María Laura D'Ambrosio

Suplente 1ª: Dra. Claudia Ayuso

COMISIONES INTERNAS

Actividades Culturales

Presidente: Dra. Silvia Morilla

Secretario: Dr. Alberto Villagra

Vocal: Dr. Anibal Bagnarelli

Prensa y Difusión

Dra. Viviana Osta

Dra. Graciela Astarita

Dra. María E. Tulli

Acreditación de Laboratorios

Dr. Gabriel Migliarino

Dra. Silvia Depardo

Dra. Silvia Morilla.

Certificaciones

Dr. Edgardo Poskus

Dr. Anibal Bagnarelli

Dr. Alberto Villagra

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Cursos

Presidente: Dra. Silvia B. González

Secretaría: Dra. Claudia Ayuso

Vocales

Dra. María Soledad Caldirola

Dra. María José Rial

Dra. Liliana Maggi

Dra. Marysia Szefer

Dra. María de la Paz Domínguez

Premios y distinciones

Dr. Fernando Brites

Dr. Edgardo Poskus

Dr. Néstor Litwin

Relaciones Institucionales

Presidente: Dra. Silvia Morilla

Secretario: Dr. Néstor Litwin

Vocales:

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Raquel Osatinsky

COMITÉ ASESOR CIENTÍFICO

Dra. Alicia Arechavala

Dra. Mónica Aixalá

Dra. Alicia Blanco

Dra. Ana María Blanco

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Silvia González

Dra. Raquel Osatinsky

Dra. Graciela Peluffo

Dr. Daniel Pirola

Dr. Jorge Rey

Dra. María José Rial

Dr. Otmario Roses

Dra. Sandra Rozental

Dra. Nora Slobodianik

Dra. Patricia Sorroche

Condicionantes del aumento del riesgo cardiovascular en pacientes con síndrome de Cushing activo

Boero, L.1*; Meroño, T.1; Manavela, M.2; Danilowicz, K.2; Maidana, P.1; Buttazzoni, M.3; Menafrá, M.1; Gómez Rosso, L.1; Brites, F.1

¹Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto. de Bioquímica Clínica, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. CONICET. Buenos Aires, Argentina.

²Servicio de Endocrinología del Hospital de Clínicas "José de San Martín". Buenos Aires, Argentina.

³Consultorio Privado de Endocrinología. General Pacheco. Buenos Aires.

Correspondencia: Bioq. Laura E. Boero.

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto. de Bioquímica Clínica.

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956 (1113). Buenos Aires. Argentina.

E-mail: laura.boero@hotmail.com

Tel.: 54-11-4964-8297

RESUMEN

El síndrome de Cushing constituye una condición patológica caracterizada por una elevación persistente e inapropiada de los niveles circulantes de glucocorticoides y cuya tasa de mortalidad resulta 4 veces mayor que la esperada en la población general. Los eventos cardiovasculares son, en su mayoría, los responsables de la elevada morbi-mortalidad de los pacientes afectados. El objetivo del estudio fue caracterizar las alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, y evaluar la presencia de factores de riesgo aterogénico emergentes y biomarcadores de aterosclerosis en pacientes con síndrome de Cushing activo. Se estudiaron 32 pacientes con síndrome de Cushing activo (23 mujeres) y 32 controles pareados por sexo y edad [34 (27 - 42) vs. 33 (27 - 45) años, pacientes y controles, respectivamente]. Fueron evaluados parámetros antropométricos, niveles plasmáticos de cortisol, marcadores de resistencia insulínica, incluidas las adipocitoquinas adiponectina y resistina, perfil lipoproteico, actividades de enzimas y proteínas asociadas a lipoproteínas, niveles de lipoproteínas de baja densidad oxidadas y de proteína C reactiva ultrasensible, y recuento de leucocitos. El grupo de pacientes con síndrome de Cushing presentó características típicas de la patología como sobrepeso, obesidad central e hipercortisolismo (28 ± 12 vs. 12 ± 5 $\mu\text{g/dl}$, $p < 0.0001$, respectivamente). Los pacientes también exhibieron un estado de resistencia insulínica, con elevación de la concentración de resistina [(16 (10 - 22) vs. 6 (5 - 9) ng/ml, $p < 0.0001$, respectivamente)], un perfil lipoproteico más aterogénico, aumento de los niveles de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (100 ± 31 vs. 75 ± 32 U/l, $p < 0.05$, respectivamente) y un estado proinflamatorio caracterizado por aumento de la concentración de proteína C reactiva ultrasensible [1,2 (0,6 - 3,1) vs. 0,6 (0,3 - 1,1) mg/l, $p < 0,05$] y mayor recuento de leucocitos ($9,5 \pm 2,6$ vs. $6,5 \pm 1,4 \cdot 10^3$ células/ μl , $p < 0,0001$). En conclusión, la conjunción de las alteraciones metabólicas y la presencia de factores de riesgo y biomarcadores de inflamación y aterosclerosis en los pacientes con síndrome de Cushing activo condicionan un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular.

Palabras clave: síndrome de Cushing, aterosclerosis, inflamación, resistencia insulínica, enfermedad cardiovascular

SUMMARY

Cushing syndrome constitutes a pathological condition characterised by a continuous and inappropriate elevation of circulating glucocorticoids and whose mortality is 4 times higher than in general population. Cardiovascular events are mostly responsible for the elevated morbidity and mortality of affected patients. The aim of the present study was to characterise the alterations in carbohydrate and lipid metabolism, and to evaluate the presence of novel atherogenic risk factors and biomarkers on atherosclerosis in patients with active Cushing syndrome. We studied 32 patients with active Cushing syndrome (23 women) y 32 sex and age-matched controls [34 (27 - 42) vs. 33 (27 - 45) years, patients and controls, respectively]. The following evaluations were carried out: anthropometric parameters, cortisol plasma levels, markers of insulin resistance, including the adipocytokines adiponectin and resistin, lipoprotein profile, activities of lipoprotein-associated

enzymes and proteins, oxidized low density lipoprotein and high sensitive C reactive protein levels, and leukocyte count. The group of patients with Cushing syndrome presented typical characteristics of the pathology such as overweight, central obesity and hypercortisolism. (28 ± 12 vs. 12 ± 5 $\mu\text{g/dl}$, $p < 0.0001$, respectively). Patients also exhibited an insulin resistant state, with high resistin levels [16 ($10 - 22$) vs. 6 ($5 - 9$) ng/ml , $p < 0.0001$, respectively], a more atherogenic lipoprotein profile, high oxidized low density lipoprotein levels (100 ± 31 vs. 75 ± 32 U/l , $p < 0.05$, respectively) and a proinflammatory state characterised by increased high sensitive C reactive protein levels [1.2 ($0.6 - 3.1$) vs. 0.6 ($0.3 - 1.1$) mg/l , $p < 0.05$] and higher leukocyte count (9.5 ± 2.6 vs. $6.5 \pm 1.4 \cdot 10^3$ $\text{cells}/\mu\text{l}$, $p < 0.0001$). In conclusion, the combination of the metabolic alterations observed and the presence of risk factors and biomarkers of inflammation and atherosclerosis in patients with active Cushing syndrome determine an increased risk of cardiovascular disease.

Key words: Cushing syndrome, atherosclerosis, inflammation, insulin resistance, cardiovascular disease

Introducción

El síndrome de Cushing (SC) abarca una constelación de signos y síntomas resultantes de la elevación persistente e inapropiada de los niveles circulantes de glucocorticoides¹. El SC se presenta más frecuentemente en mujeres que en hombres (relación mujer / hombre: 3 / 1)². Fisiopatológicamente, el SC de causa endógena se debe a la secreción excesiva y sostenida de cortisol por las glándulas suprarrenales y ofrece una gran riqueza semiológica, aunque ninguno de sus signos o síntomas son patognomónicos³.

Se debe resaltar que la tasa de mortalidad en los pacientes con SC resulta 4 veces mayor que la esperada en la población general pareada por sexo y edad. Entre las distintas causas, los eventos cardiovasculares son en su mayoría los responsables de la elevada morbi-mortalidad observada en estos pacientes^{2,4}. Más aún, en pacientes con SC se ha reportado la presencia de disfunción endotelial, evento que precede tanto a la aterosclerosis, como a los eventos cardiovasculares⁵. En particular, los pacientes con SC presentaron menor dilatación dependiente de flujo que los sujetos controles, situación que revirtió luego del tratamiento médico y/o quirúrgico^{6,7}. Si bien estos resultados sugieren un rol directo del hiper cortisolismo, no es posible descartar la influencia de algunos de los otros factores predisponentes a enfermedad cardiovascular asociados al SC como la obesidad central, la hipertensión arterial, la intolerancia a la glucosa, las alteraciones lipídicas y un estado protrombótico⁸. Por otro lado, es sabido que los pacientes con SC presentan un aumento del tejido adiposo con una distribución centrípeta, que se relaciona con el incremento del riesgo cardiovascular en la población general⁹. De hecho, el tejido adiposo visceral es más resistente a la acción de la insulina que el tejido adiposo subcutáneo y posee la capacidad de secretar hormonas y diferentes adipocitoquinas, como adiponectina, leptina y resistina, capaces de modular distintos procesos fisiopatológicos^{10,11}. Al respecto, se ha reportado que el cortisol inhibe directamente la secreción de la adiponectina, única adipocitoquina con función antiinflamatoria y antiaterogénica¹². Por otro lado, la resistina, otra adipoquina ini-

cialmente asociada al desarrollo de resistencia insulínica en el humano¹³ y secretada por otros tipos celulares además del adipocito, como células mononucleares, macrófagos y células de médula ósea, sería susceptible de encontrarse modificada en pacientes con SC^{14,15}. La resistina no solo se asociaría a resistencia a la insulina, sino también al desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular a través de una acción directa a nivel del endotelio, causando disfunción endotelial^{16,17}.

El objetivo del estudio fue caracterizar las alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, estudiar indicadores de la funcionalidad lipoproteica, tanto de las lipoproteínas aterogénicas como de las ateroprotectoras, y evaluar la presencia de factores de riesgo aterogénico emergentes y biomarcadores de aterosclerosis en pacientes con SC activo en comparación con controles sanos pareados por sexo y edad.

Materiales y métodos

Sujetos

Fueron seleccionados 32 pacientes con SC activo, vírgenes de tratamiento durante 2010 y 2011, que concurren al Servicio de Endocrinología del Hospital de Clínicas "José de San Martín". Fueron comparados con controles voluntarios sanos pareados por sexo y edad, que presentaban índice de masa corporal (IMC) menor de 25 kg/m^2 . El diagnóstico de SC activo se realizó sobre la base de la presencia de signos y síntomas clínicos propios de la enfermedad (obesidad centrípeta, hipertensión arterial, estrías rojo vinosas, giba de búfalo, hematomas, diabetes, etcétera), a los niveles basales elevados de cortisol y a la falta de supresión de la hiper cortisolemia a las 8 horas luego de la administración de 1 mg de dexametasona a las 23 horas del día anterior (cortisololemia $> 1,8 \text{ ug/dl}$). En todos los pacientes y controles, se registró peso, altura, y circunferencia de cintura, y se realizó una anamnesis exhaustiva. Fueron excluidos los individuos que presentaban alteraciones tiroideas, renales, hepáticas, antecedentes de eventos cardiovasculares, a todo aquel que se encontrara bajo tratamiento farmacológico que afec-

tase el metabolismo lipídico y/o glucídico, a los fumadores y alcohólicos. Ningún paciente presentaba deficiencia de otra hormona hipofisaria al momento de su inclusión en el estudio. Todos los participantes del estudio firmaron un Consentimiento Informado. El proyecto fue aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Res. Nro. 2641, Expte. N° 0738916/2011).

Protocolo de estudio y muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena antecubital después de 12 horas de ayuno, que fueron recolectadas en tubos secos y centrifugadas a 1500 x g durante 15 minutos a 4° C. Se separó el suero, el cual fue conservado a 4° y -70° C.

Medida de parámetros bioquímicos generales

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa y el hemograma completo mediante métodos estandarizados. Se emplearon inmunoensayos específicos para evaluar los niveles de cortisol plasmático (*Access*®, *Beckman Coulter*™) e insulina (RIA, *Diagnostics Products Corp.*, Los Angeles, CA, USA). Se calcularon los índices HOMA-IR, mediante la fórmula $[\text{Glucosa (mmol/l)} \cdot \text{Insulina } (\mu\text{U/ml})] / 22,5$ y QUICKI [*Quantitative Sensitivity Check Index*] mediante la fórmula $1 / [\ln \text{Glucosa (mmol/l)} + \ln \text{Insulina (mU/l)}]$.

Determinación del perfil de lípidos, lipoproteínas y apoproteínas

Fueron cuantificados los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos mediante métodos estandarizados (Roche, Mannheim, Alemania) en un autoanalizador Hitachi 917. Los CV intraensayo para las determinaciones de colesterol total y triglicéridos fueron 1,1 % y 1,3 %, respectivamente. Los CV interensayo fueron 1,5 % y 2,4 %, respectivamente. Se aislaron las HDL en el sobrenadante obtenido luego de la precipitación selectiva de las lipoproteínas con apo B utilizando reactivo precipitante 0,44 mmol/l ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio¹⁸. Los CV intraensayo e interensayo para C-HDL fueron 3,2 % y 3,8 %, respectivamente. Se evaluó el nivel de C-LDL como la diferencia entre el colesterol total y el colesterol contenido en el sobrenadante obtenido después de la precipitación selectiva de LDL con 10 g/l polivinil sulfato en polietilenglicol (600 Da; 2,5 % P/V; pH 6,7)¹⁹. Los CV intra e interensayo fueron 4,7 % y 5,0 %, respectivamente. Se calculó el colesterol no-HDL como la diferencia entre el colesterol total y el C-HDL. Se obtuvo el C-VLDL por diferencia entre el colesterol de los sobrenadantes de las precipitaciones de C-LDL y de C-HDL. Se realizó el dosaje de apo B y apo A-I por inmunoturbidimetría (Roche, Mannheim, Alemania) en un autoanalizador Selectra 2 (Wiener, Argentina). Los CV intra e interensayo para la determinación de apo B fueron 1,2 y 2,1 %, respectivamente y, para apo A-I 1,9 y 2,4 %, respectivamente. Se expresaron los resultados en mg/dl. Se estimaron los siguientes cocientes: colesterol total / C-HDL, triglicéridos / C-HDL, C-LDL / apo

B, y C-HDL / apo A-I. Se determinaron los niveles de ácidos grasos libres (NEFA) por un método enzimático colorimétrico (*Randox Laboratory Ltd.*, Reino Unido).

Medida de la actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP)

Se determinó la actividad de la CETP en muestras de suero siguiendo el método radiométrico previamente descrito con pequeñas modificaciones²⁰. Para ello, se evaluó la capacidad del suero para promover la transferencia de colesterol esterificado tritiado desde la fracción de HDL₃ marcada biosintéticamente [³H-CE-HDL₃] (*NEN Life Science Products*, Boston, EEUU) hacia las lipoproteínas con apo B presentes en el suero. Las muestras séricas fueron incubadas con ³H-CE-HDL₃ (50 μmol/l de colesterol) e iodoacetato (1,5 mmol/l) en buffer TBS (pH=7,4) durante 3 horas a 37° C. Luego de la incubación, se separaron las lipoproteínas con apo B de las HDL mediante el método de precipitación selectiva utilizando ácido fosfotúngstico (0,44 mmol/l) en presencia de iones magnesio. Se midió la radioactividad en la mezcla de reacción y en el sobrenadante que contenía la fracción de HDL en un contador de centelleo líquido (Packard 210 TR; *Packard Instruments*, *Meridians*, CT). Los resultados fueron expresados como porcentaje de colesterol esterificado tritiado transferido desde la fracción de HDL₃ hacia las lipoproteínas con apo B, por ml, por hora. Todas las muestras fueron procesadas en el mismo ensayo.

Medida de la actividad de fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas (Lp-PLA₂)

La actividad de Lp-PLA₂ fue evaluada empleando el ensayo radiométrico descrito por Blank y col.²¹ con algunas modificaciones. La extracción del acetato marcado, liberado luego de la acción de la enzima sobre el sustrato lipídico, fue realizada mediante partición líquido-líquido y para su cuantificación se midió la radioactividad de la fase acuosa. Brevemente, la mezcla de reacción estaba compuesta de 50 μl de suero diluido 1/50 y de 10 μmol/l 1-hexadecil-2-[³H]acetil-glicerol-3-fosfocolina [actividad específica 25 uCi/μmol], disueltos en un volumen total de 0,5 ml de *buffer* fosfato salino (PBS), pH 7,4. El sustrato presente en el medio de reacción constituyó una mezcla entre las especies fría y marcada con tritio. Estos sustratos se encontraban disueltos en sus respectivos solventes, por lo cual fueron sometidos a evaporación secuencial bajo corriente de N₂ para luego ser redisueltos juntos en *buffer* PBS. A continuación, se realizó un paso de sonicación consistente en 1 ciclo de 5 minutos. Se llevó a cabo la incubación de la mezcla de reacción a 37° C durante 5 minutos. Se detuvo la reacción enzimática ubicando los tubos en baño de hielo y adicionando rápidamente 1,5 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se agregaron 0,5 ml de solución saturada de NaHCO₃ y se agitó nuevamente. Se centrifugaron los tubos a baja velocidad durante 15 minutos, se recuperó la fase acuosa y se la lavó dos veces con cloroformo utilizando los pasos de agitación y centrifugación en ambos

casos. Finalmente, se midió la radioactividad de la fase acuosa de cada muestra y de los blancos en un contador de centelleo líquido (Packard 210 TR; *Packard Instruments, Meridians, CT*). También, se midió la radioactividad del *buffer* sustrato. Se expresaron los resultados como μmol de factor activador de plaquetas liberado por mililitro de suero por hora de reacción. Todas las muestras fueron procesadas en el mismo ensayo.

Medida de la actividad de paraoxonasa 1 (PON 1)

La enzima PON 1 fue evaluada por medio de dos sustratos diferentes: paraoxón (actividad paraoxonasa) y fenilacetato (actividad arilesterasa). Se midieron ambas actividades siguiendo el método de Furlong y col.²².

Se determinó la actividad paraoxonasa añadiendo 20 μl de suero a 2 ml de *buffer* TRIS / HCl (100 mmol/l, pH 8,0) conteniendo 2 mmol/l CaCl_2 , 1 mol/l NaCl y 2,6 mmol/l paraoxón (0,0-dietil-0-p-nitrofenil-fosfato). Se monitoreó la tasa de generación de p-nitrofenol a una longitud de onda de 405 nm y a una temperatura de incubación de 25° C, en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón). Se registró el aumento de absorbancia en intervalos de 30 segundos durante un lapso de 5 minutos, luego de 30 segundos de un período de preincubación. Se calculó la actividad enzimática a partir del coeficiente de extinción molar (17.000 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y se expresaron los resultados como ηmol de paraoxón hidrolizado por mililitro de suero por minuto de reacción.

Se evaluó la actividad arilesterasa añadiendo 20 μl de suero diluido 1/20 a 2 ml de *buffer* TRIS / acetato (50 mmol/l, pH 7,8) que contenía 20 mmol/l CaCl_2 y 4,4 mmol/l fenilacetato. Se monitoreó la tasa de generación de fenol a una longitud de onda de 270 nm y a una temperatura de incubación de 25° C, en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón). Se registró el aumento de absorbancia en intervalos de 30 segundos durante un lapso de 5 minutos, luego de 30 segundos de un período de preincubación. Se calculó la actividad enzimática a partir del coeficiente de extinción molar (1.310 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y se expresan los resultados como μmol de fenilacetato hidrolizado por mililitro de suero, por minuto de reacción. Dado la labilidad del sustrato en solución acuosa, se corrigió el impacto de la inestabilidad en la medida de la actividad. Todas las muestras fueron procesadas en el mismo ensayo.

Determinación de adiponectina, resistina, LDL oxidadas y PCRus

Se emplearon enzimoimmunoensayos (ELISA) para evaluar los niveles de adiponectina, resistina, (R&D, Systems, EE.UU.) y LDL oxidadas (Mercodia, Sweden). Los niveles de PCRus fueron determinados por un método ultrasensible (Roche, Mannheim, Alemania) en un autoanalizador Hitachi 917.

Análisis estadístico

El tamaño muestral para obtener diferencias estadísticamente significativas y potencia de 80 % no debió ser infe-

rior a 15 pacientes. Se analizó la distribución de los datos mediante el test de Shapiro-Wilks y los mismos fueron expresados como media \pm desvío estándar si la distribución era paramétrica o como mediana (rango intercuartil) en el caso de distribución no paramétrica. Para evaluar diferencias entre grupos, se emplearon métodos paramétricos o no paramétricos, y fueron incluidas covariables según correspondía. Se implementó regresión simple. Los tests fueron considerados significativos con un $p < 0,05$ en la situación bilateral (2 colas). Para la realización del análisis estadístico, se utilizó el programa Infostat (Universidad Nacional de Córdoba) y el software SPSS 17.0 (IBM, Chicago, EE.UU.).

Resultados

Las características clínicas, los niveles de cortisol plasmático y los marcadores de resistencia insulínica de 32 pacientes adultos con diagnóstico de SC activo y de 32 controles pareados por sexo y edad se muestran en la tabla 1. Todos los pacientes con diagnóstico de SC presentaron falta de supresión de la hipercortisolemia a las 8 horas luego de la administración de 1 mg de dexametasona a las 23 horas del

Figura 1. Niveles de resistina en pacientes con síndrome de Cushing y sujetos controles ($p < 0,0001$).

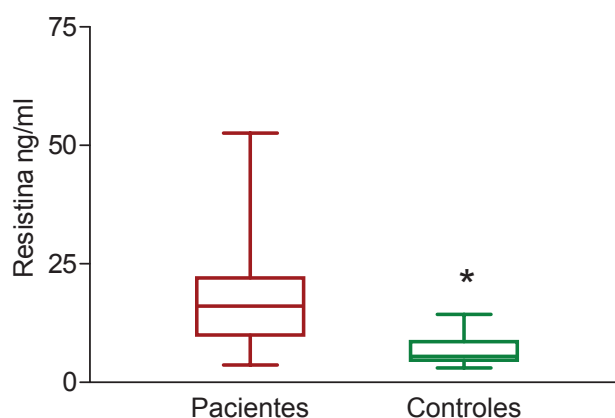
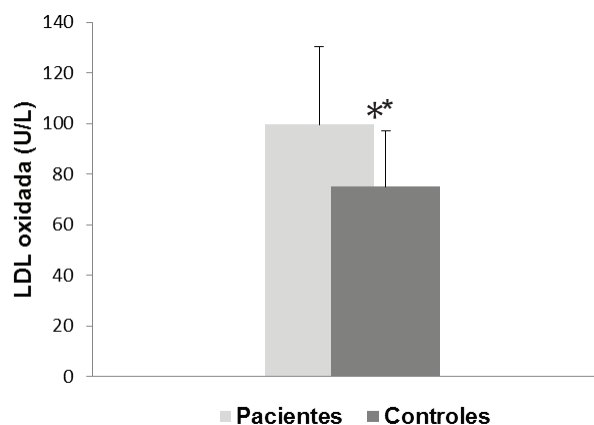


Figura 2. Niveles de LDL oxidadas en pacientes con síndrome de Cushing y sujetos controles ($p < 0,05$).



día anterior exhibiendo concentraciones mayores a 1,8 µg/dl). Es destacable la gran heterogeneidad en las variables y el bajo número de ellas que presentaron una distribución normal. Esta observación es consecuencia de lo ya descrito para esta patología y se basa principalmente en el patrón heterogéneo de los efectos del hipercortisolismo entre individuos. Como características distintivas, los pacientes estudiados fueron en su mayoría adultos jóvenes (edad menor a 45 años, 78 %), de sexo femenino (70 %) y con cierto grado de sobrepeso / obesidad con una distribución centrípeta.

Acorde con las características típicas de la patología en estudio, los pacientes con SC activo presentaron niveles de cortisol significativamente elevados y todos los indicadores de resistencia insulínica alterados, así como niveles incrementados de resistina, adipocitoquina recientemente postulada como marcador de resistencia insulínica (Fig. 1)¹³. A pesar de su relación con la resistencia insulínica y la obesidad abdominal, los niveles de adiponectina no fueron diferentes entre ambos grupos [10 (7 - 14) vs. 11 (7 - 15) µg/ml; $p > 0,05$].

En la tabla 2, se presenta el perfil de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas de los pacientes con SC activo y sujetos controles. Los pacientes con SC presentaron niveles significativamente más altos de triglicéridos a expensas de las VLDL, mayor concentración de colesterol total, de C-no-HDL y de apo B, respecto de los controles. En relación a los índices calculados a partir de los parámetros lipídicos, se observó un aumento del cociente triglicéridos / C-HDL, propuesto como indicador de resistencia insulínica y de la proporción de LDL pequeñas y densas; esto último también fue sugerido por la disminución del índice C-LDL / apo B. Los niveles de apo A-I, principal apoproteína de las HDL, fueron significativamente mayores en los pacientes con SC y el cociente C-HDL / apo A-I también mostró diferencias significativas, aunque en este caso la relación fue menor en los pacientes que en los controles.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las actividades de proteínas y enzimas asociadas a lipoproteínas entre los pacientes con SC y controles: CETP (170 ± 35 vs. 175 ± 52 %/ml.h, respectivamente); Lp-PLA₂ (8,2 ± 1,5 vs. 8,0 ± 1,9 µmol/ml.h, respectivamente), PON 1 [302 (151 - 571) vs. 209 (157 - 453 nmol/ml.min, respectivamente) y ARE (158 ± 47 vs. 148 ± 35 µmol/ml.min, respectivamente).

Al evaluar los niveles de LDL oxidada, los pacientes con SC presentaron niveles más elevados que los controles (Fig. 2). Entre los marcadores de inflamación, solamente se observaron mayores niveles de PCRus [1,2 (0,6 - 3,1) vs. 0,6 (0,3 - 1,1) mg/l, $p < 0,05$] y mayor recuento de leucocitos (9,5 ± 2,6 vs. 6,5 ± 1,4.10³ células/µl, $p < 0,0001$) en los pacientes con SC que en los controles.

Discusión

En este estudio de un grupo de pacientes con SC activo en comparación con controles pareados por sexo y edad,

Tabla 1. Características clínicas, niveles de cortisol y marcadores de resistencia insulínica de pacientes con síndrome de Cushing y sujetos controles

	Pacientes con síndrome de Cushing	Sujetos controles
N	32	32
Mujeres/Hombres	23 / 9	23 / 9
Edad (años)	34 (27 - 42)	33 (27 - 45)
IMC (kg/m²)	29 (26 - 33)	22 (21 - 24) ^a
CC (cm)	96 (91 - 113)	85 (78 - 91) ^b
Cortisol (µg/dl)	28 ± 12	12 ± 5,0 ^a
Glucosa (mg/dl)	93 (84 - 123)	85 (78 - 96) ^d
Insulina (mU/l)	6,5 (4,8 - 12,0)	4,8 (2,4 - 7,0) ^a
HOMA-IR	2,0 (1,0 - 3,0)	1,0 (0,5 - 1,5) ^c
QUICKI	0,26 (0,24 - 0,32)	0,32 (0,29 - 0,41) ^c
NEFA (nmol/l)	0,7 (0,6 - 1,1)	0,6 (0,5 - 0,8)

IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment*; QUICKI, *Quantitative insulin sensitivity check index*; NEFA, ácidos grasos no esterificados. Los resultados están expresados como media ± DS si la distribución de los datos es paramétrica o como mediana (rango intercuartilo) si la distribución es no paramétrica. ^a $p < 0,0001$; ^b $p < 0,001$; ^c $p < 0,01$; ^d $p < 0,05$ vs. pacientes con síndrome de Cushing.

Tabla 2. Perfil de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas de pacientes con síndrome de Cushing y sujetos controles

	Pacientes con síndrome de Cushing (n=32)	Sujetos controles (n=32)
TG (mg/dl)	130 (88 - 205)	75 (52 - 91) ^a
CT (mg/dl)	216 (161 - 253)	178 (162 - 210) ^c
C-VLDL (mg/dl)	23 (16 - 32)	14 (11 - 19) ^b
C-LDL (mg/dl)	120 (86 - 157)	106 (93 - 138)
C-HDL (mg/dl)	53 (42 - 65)	53 (45 - 63)
C-no-HDL (mg/dl)	154 (111 - 201)	124 (111 - 152) ^a
Apo B (mg/dl)	102 ± 37	78 ± 18 ^b
Apo A-I (mg/dl)	175 ± 39	152 ± 32 ^b
TG / C-HDL	2,7 (1,3 - 4,6)	1,3 (1,1 - 1,9) ^b
CT / C-HDL	4,0 (2,7 - 5,5)	3,4 (2,8 - 4,2)
C-LDL / apo B	1,30 ± 0,31	1,5 ± 0,2 ^b
C-HDL / apo A I	0,32 ± 0,06	0,37 ± 0,08 ^b

TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; Apo, apolipoproteína. Los resultados están expresados como media ± DS si la distribución de los datos es paramétrica o como mediana (rango intercuartilo) si la distribución es no paramétrica. ^a $p < 0,0001$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,05$ vs. pacientes con síndrome de Cushing.

la evaluación del metabolismo de los hidratos de carbono mostró presencia de un estado de resistencia insulínica en los pacientes con SC, que fue evidenciado a través de niveles elevados de glucosa, insulina, aumento del índice HOMA y menor índice QUICKI que en los sujetos controles. Por otro lado, la relación triglicéridos/C-HDL, propuesta como marcador de resistencia insulínica²³ fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con SC. La resistencia insulínica es considerada un importante factor de riesgo cardiovascular y los glucocorticoides desempeñan un papel rol crucial en su desarrollo. Estudios *in vivo* han demostrado que los glucocorticoides alteran la captación de glucosa por los tejidos periféricos sensibles a la acción de la insulina, aumentan la gluconeogénesis hepática, inhiben la secreción de insulina por las células beta del páncreas, pero también pueden incrementar la estimulación vagal que promueve la secreción de insulina²⁴. El balance de estos efectos determina si la resistencia insulínica estará acompañada solo de hiperglucemia, constituyendo este cuadro una intolerancia a la glucosa, o si la elevación de la glucemia estará asociada a hiperinsulinemia, lo cual sería característico de diabetes tipo 2, en pacientes con SC. En consecuencia, un adecuado mantenimiento de los niveles de cortisol o la implementación de nuevas estrategias terapéuticas que permitan manipular la acción de los glucocorticoides contribuiría a revertir parcial o totalmente el estado de resistencia insulínica en algunos pacientes con SC. De hecho, se ha observado que la inhibición de la enzima 11-beta-hidroxí esteroide deshidrogenasa tipo 1, que convierte la cortisona en cortisol en tejidos periféricos, aumenta la sensibilidad a la insulina en voluntarios sanos, reduce los niveles de glucosa en pacientes diabéticos y disminuye la formación del ateroma en modelos de roedores transgénicos²⁵. Sin embargo, se debe resaltar que pacientes con SC considerados curados y seguidos por un período de 5 años presentaron alta prevalencia de aterosclerosis y de riesgo cardiovascular probablemente debido a obesidad abdominal residual y/o a la resistencia insulínica subyacente⁸.

Uno de los mecanismos por el cual en los pacientes con SC el exceso de cortisol produce depósito de tejido adiposo visceral y la consecuente obesidad central es la inhibición en tejido adiposo de la actividad de la quinasa activada por AMP (AMP-K), principal proteína que regula la homeostasis energética²⁶. La inhibición de la AMP-K ocasiona mayor depósito de lípidos, mayor lipólisis y, en consecuencia, liberación de ácidos grasos a la circulación.

El tejido adiposo modula el metabolismo energético a través de la secreción de diferentes adipocitoquinas, de las cuales la adiponectina resulta relevante por su acción insulino sensibilizante²⁷. Los niveles de adiponectina en el grupo de pacientes con SC estudiado no fueron diferentes en relación a los sujetos controles, lo cual concuerda con lo reportado por otros investigadores^{28,29} y avalan la teoría según la cual la resistencia insulínica por exceso de cortisol no tiene su causa en la disminución de los niveles de adiponectina y,

por lo tanto, no estaría involucrada en su desarrollo en los pacientes con SC³⁰.

Por otro lado, en los últimos años, se ha estado evaluando el rol de otra adipocitoquina, la resistina, en la génesis de la resistencia insulínica. Los hallazgos obtenidos en humanos resultan absolutamente controvertidos. Algunos investigadores han encontrado niveles elevados de resistina en individuos obesos o con diabetes, mientras que otros grupos no observaron este incremento³¹⁻³⁴. Sheng y col.³⁵ reportaron que la resistina humana inducía resistencia insulínica y que el tratamiento con metformina revertía sus efectos sobre el hepatocito, lo cual sugeriría que la expresión del ARNm para resistina podría ser relevante en la sensibilidad a la insulina. En nuestro grupo de pacientes, el incremento de los niveles de resistina concuerda con lo observado por Krsek y col., quienes sólo evaluaron individuos de sexo femenino²⁸. Por otro lado, Shojima y col.³⁶ observaron un aumento en la expresión del ARN mensajero y de la resistina al administrar dexametasona a adipocitos 3T3-L1 y a tejido adiposo blanco de ratón. A pesar de que los resultados obtenidos en ratón no son extrapolables al humano, el incremento en la concentración de resistina en pacientes con SC podría deberse a un efecto directo del exceso de cortisol.

Asimismo, la elevada expresión de resistina en monocitos y macrófagos sugiere que esta adipocitoquina podría tener otro rol fisiopatológico en el humano³⁷. Se han reportado trabajos en los cuales la resistina induce disfunción endotelial vascular y proliferación de células vasculares musculares lisas favoreciendo, de esta manera, el proceso aterogénico^{38,39}.

En consecuencia, en el humano, se deben continuar los estudios para establecer el grado de participación de la resistina en la resistencia insulínica, en el proceso inflamatorio crónico subyacente a la iniciación y progresión de la aterosclerosis y en la enfermedad cardiovascular.

Por otro lado, es conocido que la resistencia insulínica es reponsable de diferentes alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de las lipoproteína⁴⁰. En el presente estudio, los pacientes con SC activo presentaron niveles más elevados de triglicéridos y colesterol total, probablemente debido a la acumulación de partículas de VLDL, además de incremento en la concentración de apo B. Esto refleja la presencia de un perfil más aterogénico en pacientes con SC activo que en sujetos controles. Más aún, los pacientes con SC presentaron una relación triglicéridos/C-HDL más alta, la cual puede ser empleada como marcador de resistencia insulínica y de mayor proporción de partículas de LDL pequeñas y densas, hallazgo que es coherente con los niveles conservados de C-LDL y aumento de apo B de los pacientes con SC²³. Es de notar que las partículas de LDL pequeñas y densas, de mayor potencial aterogénico que las partículas de mayor tamaño, son más susceptibles a los procesos oxidativos⁴¹. En este trabajo, los pacientes con SC activo exhibieron niveles significativamente aumentados de LDL oxidadas, lo cual es reflejo del proceso por medio del cual las LDL pequeñas y

densas, una vez en la íntima arterial, sufren modificaciones oxidativas y, convertidas en LDL mínimamente oxidadas, retornan parcialmente a la circulación sanguínea⁴². Esta secuencia de eventos podría estar facilitada por la falta de aumento en la actividad de PON 1, enzima a la cual se atribuye gran parte de la capacidad de las HDL para inhibir la oxidación de LDL⁴³, y por un incremento del estrés oxidativo asociado a la resistencia insulínica⁴⁴.

Los niveles de C-HDL en los pacientes con SC no se encontraron reducidos, a diferencia de lo observado en otros estudios y en pacientes con SM, condición que comparte muchas características con el SC³. Cabe destacar que la actividad de la CETP, la cual intercambia colesterol esterificado por triglicéridos entre lipoproteínas, y, consecuentemente, importante modulador de los niveles de C-HDL, fue similar en ambos grupos de sujetos⁴⁵. Por otro lado, el grado de alteraciones en el perfil de lípidos y lipoproteínas en el SC es sumamente variable, y son pocos y conflictivos los estudios sobre la prevalencia de dislipidemia frente a un exceso crónico de glucocorticoides^{3,46}. Esto es en parte atribuible a que los efectos de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo involucra tanto la lipólisis como la lipogénesis^{47,48}. Estos esteroides incrementan la lipólisis en los depósitos de grasa periférica y promueven la diferenciación del preadipocito en la grasa central. Más aún, pueden actuar sinérgicamente con la insulina favoreciendo la lipogénesis⁴⁷. Además del efecto lipolítico, los glucocorticoides modulan la movilización de los ácidos grasos libres sinergizando la acción de otras hormonas. Sin embargo, es importante tener en cuenta las evidencias más recientes que limitan el valor diagnóstico y pronóstico de los niveles de C-HDL y destacan que estos no siempre reflejan la capacidad antiaterogénica de estas lipoproteínas⁴⁹. Resulta de gran interés el hallazgo de un cociente C-HDL / apo A-I significativamente disminuido en los pacientes con SC activo con respecto a los controles. La disminución observada en esta proporción sería sugestiva de una deficiencia en la capacidad de estas partículas de HDL, que de acuerdo con el valor de apo A-I se encuentran en un número considerable, para promover el eflujo de colesterol celular, primer paso del transporte inverso del colesterol y vía ateroprotectora por excelencia⁵⁰.

En conclusión, los hallazgos reportados en este estudio contribuyen a identificar los factores responsables de la mayor morbi-mortalidad por enfermedad cardiovascular en los pacientes con SC activo, así como a una mejor interpretación de los mecanismos involucrados. El hipercortisolismo *per se*, la resistencia insulínica, la presencia de un perfil lipoproteico más aterogénico y el estado proinflamatorio resultan determinantes en la inducción de la disfunción endotelial, la formación de estrías grasas, y la constitución definitiva de la placa ateromatosa, secuencia de eventos que conducen a la aparición de las manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular.

Referencias bibliográficas

1. Ross, N.S. (1994) Epidemiology of Cushing's syndrome and subclinical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 23: 539-46.
2. Lindholm, J., Juul, S., Jorgensen, J.O., Astrup, J., Bjerrre, P., Feldt-Rasmussen, U., Hagen, C., Jorgensen, J., Kosteljanetz, M., Kristensen, L., Laurberg, P., Schmidt, K. & Weeke, J. (2001) Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 117-23.
3. Arnaldi, G., Angeli, A., Atkinson, A.B., Bertagna, X., Cavagnini, F., Chrousos, G.P., Fava, G.A., Findling, J.W., Gaillard, R.C., Grossman, A.B., Kola, B., Lacroix, A., Mancini, T., Mantero, F., Newell-Price, J., Nieman, L.K., Sonino, N., Vance, M.L., Giustina, A. & Boscaro, M. (2003) Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 5593-602.
4. Etxabe, J. & Vazquez, J.A. (1994) Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 40: 479-84.
5. Charakida, M., Masi, S., Luscher, T.F., Kastelein, J.J. & Deanfield, J.E. (2010) Assessment of atherosclerosis: the role of flow-mediated dilatation. *Eur Heart J*, 31: 2854-61.
6. Baykan, M., Erem, C., Gedikli, O., Hacıhasanoglu, A., Erdogan, T., Kocak, M., Durmus, I., Korkmaz, L. & Celik, S. (2007) Impairment of flow-mediated vasodilatation of brachial artery in patients with Cushing's Syndrome. *Endocrine*, 31: 300-4.
7. Akaza, I., Yoshimoto, T., Tsuchiya, K. & Hirata, Y. (2010) Endothelial dysfunction associated with hypercortisolism is reversible in Cushing's syndrome. *Endocr J*, 57: 245-52.
8. Colao, A., Pivonello, R., Spiezia, S., Faggiano, A., Ferone, D., Filippella, M., Marzullo, P., Cerbone, G., Siciliani, M. & Lombardi, G. (1999) Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 2664-72.
9. Kemink, S.A., Frijns, J.T., Hermus, A.R., Pieters, G.F., Smals, A.G. & van Marken Lichtenbelt, W.D. (1999) Body composition determined by six different methods in women bilaterally adrenalectomized for treatment of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 3991-9.
10. Veilleux, A., Caron-Jobin, M., Noel, S., Laberge, P.Y. & Tchernof, A. (2011) Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*, 60: 1504-11.
11. Balistreri, C.R., Caruso, C. & Candore, G. (2010) The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*, 2010: 802078.
12. Fallo, F., Scarda, A., Sonino, N., Paoletta, A., Boscaro, M.

- M., Pagano, C., Federspil, G. & Vettor, R. (2004) Effect of glucocorticoids on adiponectin: a study in healthy subjects and in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*, 150: 339-44.
13. Schwartz, D.R. & Lazar, M.A. (2011) Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab*, 22: 259-65.
 14. Lucero, D., Zago, V., Lopez, G.I., Graffigna, M., Fainboim, H., Miksztoicz, V., Merono, T., Belli, S., Levalle, O., Wikinski, R., Brites, F., Berg, G. & Schreier, L. (2011) Pro-inflammatory and atherogenic circulating factors in non-alcoholic fatty liver disease associated to metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*, 412: 143-7.
 15. Patel, L., Buckels, A.C., Kinghorn, I.J., Murdock, P.R., Holbrook, J.D., Plumpton, C., Macphee, C.H. & Smith, S.A. (2003) Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*, 300: 472-6.
 16. Filkova, M., Haluzik, M., Gay, S. & Senolt, L. (2009) The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol*, 133: 157-70.
 17. Gnacinska, M., Malgorzewicz, S., Stojek, M., Lysiak-Szydłowska, W. & Sworcza, K. (2009) Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci*, 54: 150-7.
 18. Warnick, G.R., Benderson, J. & Albers, J.J. (1982) Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem*, 28: 1379-88.
 19. Assmann, G., Jabs, H.U., Kohnert, U., Nolte, W. & Schriewer, H. (1984) LDL-cholesterol determination in blood serum following precipitation of LDL with polyvinylsulfate. *Clin Chim Acta*, 140: 77-83.
 20. Lagrost, L., Gandjini, H., Athias, A., Guyard-Dangremont, V., Lallemand, C. & Gambert, P. (1993) Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb*, 13: 815-25.
 21. Blank, M.L., Hall, M.N., Cress, E.A. & Snyder, F. (1983) Inactivation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by a plasma acetylhydrolase: higher activities in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 113: 666-71.
 22. Furlong, C.E., Richter, R.J., Seidel, S.L., Costa, L.G. & Motulsky, A.G. (1989) Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem*, 180: 242-7.
 23. McLaughlin, T., Reaven, G., Abbasi, F., Lamendola, C., Saad, M., Waters, D., Simon, J. & Krauss, R.M. (2005) Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *Am J Cardiol*, 96: 399-404.
 24. Andrews, R.C. & Walker, B.R. (1999) Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci (Lond)*, 96: 513-23.
 25. McAuley, K.A., Williams, S.M., Mann, J.I., Walker, R.J., Lewis-Barned, N.J., Temple, L.A. & Duncan, A.W. (2001) Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care*, 24: 460-4.
 26. Kola, B., Christ-Crain, M., Lolli, F., Arnaldi, G., Giacchetti, G., Boscaro, M., Grossman, A.B. & Korbonits, M. (2008) Changes in adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase as a mechanism of visceral obesity in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 4969-73.
 27. Barontini, M., Garcia-Rudaz, M.C. & Veldhuis, J.D. (2001) Mechanisms of hypothalamic-pituitary-gonadal disruption in polycystic ovarian syndrome. *Arch Med Res*, 32: 544-52.
 28. Krsek, M., Silha, J.V., Jezkova, J., Hana, V., Marek, J., Weiss, V., Stepan, J.J. & Murphy, L.J. (2004) Adipokine levels in Cushing's syndrome; elevated resistin levels in female patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 60: 350-7.
 29. Libe, R., Morpurgo, P.S., Cappiello, V., Maffini, A., Bondioni, S., Locatelli, M., Zavanone, M., Beck-Peccoz, P. & Spada, A. (2005) Ghrelin and adiponectin in patients with Cushing's disease before and after successful transphenoidal surgery. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 62: 30-6.
 30. Shinahara, M., Nishiyama, M., Iwasaki, Y., Nakayama, S., Noguchi, T., Kambayashi, M., Okada, Y., Tsuda, M., Stenzel-Poore, M.P., Hashimoto, K. & Terada, Y. (2009) Plasma adiponectin levels are increased despite insulin resistance in corticotropin-releasing hormone transgenic mice, an animal model of Cushing syndrome. *Endocr J*, 56: 879-86.
 31. Fujinami, A., Obayashi, H., Ohta, K., Ichimura, T., Nishimura, M., Matsui, H., Kawahara, Y., Yamazaki, M., Ogata, M., Hasegawa, G., Nakamura, N., Yoshikawa, T., Nakano, K. & Ohta, M. (2004) Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*, 339: 57-63.
 32. Youn, B.S., Yu, K.Y., Park, H.J., Lee, N.S., Min, S.S., Youn, M.Y., Cho, Y.M., Park, Y.J., Kim, S.Y., Lee, H.K. & Park, K.S. (2004) Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 150-6.
 33. Degawa-Yamauchi, M., Bovenkerk, J.E., Juliar, B.E., Watson, W., Kerr, K., Jones, R., Zhu, Q. & Considine, R.V. (2003) Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 5452-5.
 34. Heilbronn, L.K., Rood, J., Janderova, L., Albu, J.B., Kelley, D.E., Ravussin, E. & Smith, S.R. (2004) Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects.

- J Clin Endocrinol Metab, 89: 1844-8.
35. Sheng, C.H., Di, J., Jin, Y., Zhang, Y.C., Wu, M., Sun, Y. & Zhang, G.Z. (2008) Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. *Endocrine*, 33: 135-43.
 36. Shojima, N., Sakoda, H., Ogihara, T., Fujishiro, M., Katagiri, H., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Inukai, K., Abe, M., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. & Asano, T. (2002) Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes*, 51: 1737-44.
 37. Jung, H.S., Park, K.H., Cho, Y.M., Chung, S.S., Cho, H.J., Cho, S.Y., Kim, S.J., Kim, S.Y., Lee, H.K. & Park, K.S. (2006) Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 69: 76-85.
 38. Verma, S., Li, S.H., Wang, C.H., Fedak, P.W., Li, R.K., Weisel, R.D. & Mickle, D.A. (2003) Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*, 108: 736-40.
 39. Calabro, P., Samudio, I., Willerson, J.T. & Yeh, E.T. (2004) Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*, 110: 3335-40.
 40. Colhoun, H.M., Taskinen, M.R., Otvos, J.D., Van Den Berg, P., O'Connor, J. & Van Tol, A. (2002) Relationship of phospholipid transfer protein activity to HDL and apolipoprotein B-containing lipoproteins in subjects with and without type 1 diabetes. *Diabetes*, 51: 3300-5.
 41. Arai, T., Yamashita, S., Hirano, K., Sakai, N., Kotani, K., Fujioka, S., Nozaki, S., Keno, Y., Yamane, M., Shinohara, E. & et al. (1994) Increased plasma cholesteryl ester transfer protein in obese subjects. A possible mechanism for the reduction of serum HDL cholesterol levels in obesity. *Arterioscler Thromb*, 14: 1129-36.
 42. Stocker, R. & Kearney, J.F., Jr. (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 84: 1381-478.
 43. Parthasarathy, S., Litvinov, D., Selvarajan, K. & Garelnabi, M. (2008) Lipid peroxidation and decomposition--conflicting roles in plaque vulnerability and stability. *Biochim Biophys Acta*, 1781: 221-31.
 44. Hansel, B., Giral, P., Nobecourt, E., Chantepie, S., Bruckert, E., Chapman, M.J. & Kontush, A. (2004) Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 4963-71.
 45. Park, K.H., Shin, D.G., Kim, J.R., Hong, J.H. & Cho, K.H. (2010) The functional and compositional properties of lipoproteins are altered in patients with metabolic syndrome with increased cholesteryl ester transfer protein activity. *Int J Mol Med*, 25: 129-36.
 46. Lee, K.H., Choi, E., Chun, Y.S., Kim, M.S. & Park, J.W. (2006) Differential responses of two degradation domains of HIF-1alpha to hypoxia and iron deficiency. *Biochimie*, 88: 163-9.
 47. Vegiopoulos, A. & Herzig, S. (2007) Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*, 275: 43-61.
 48. Macfarlane, D.P., Forbes, S. & Walker, B.R. (2008) Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol*, 197: 189-204.
 49. Berenson, G.S., Srinivasan, S.R., Bao, W., Newman, W.P., Tracy, R.E. & Wattigney, W.A. (1998) Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med*, 338: 1650-6.
 50. Prosser, H.C., Ng, M.K. & Bursill, C.A. (2012) The role of cholesterol efflux in mechanisms of endothelial protection by HDL. *Curr Opin Lipidol*, 23: 182-9.