



LA HIPERGLUCEMIA Y EL DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS Y PROTEÍNAS.

Danay Heredia¹, Douglas Fernández¹, Jesús Rodríguez¹, Elba Rodríguez², Lucy Santana², Emilio González³, María Gómez⁴.

- 1. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba**
- 2. Centro de Atención y Educación al Paciente Diabético de Villa Clara.**
- 3. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.**
- 4. Policlínico “Chiqui Gómez Lubián” de Santa Clara. Villa Clara**

Correspondencia: Laboratorio Clínico. Edificio 109 apto 9, entre 6ta y Doble Vía. Reparto Vigía Sur. Santa Clara. Villa Clara. Cuba

Email: danayhr@infomed.sld.cu

Los cambios significativos en la estructura y metabolismo de los lípidos y proteínas en la diabetes mellitus, por lo general son de naturaleza oxidativa, lo que conlleva al desarrollo de complicaciones vasculares. Determinar parámetros bioquímico clínicos e indicadores de daño oxidativo en lípidos y proteínas en pacientes diabéticos tipo 1. Fueron utilizadas 100 muestras de suero; 40 de pacientes diagnosticados con Diabetes mellitus tipo 1 provenientes de las consultas de endocrinología del “Centro de Atención al Paciente Diabético” de la provincia de Villa Clara y 60 individuos supuestamente sanos tomados como control. Los estudios químicos clínicos incluyeron la glucemia, colesterol total, triglicéridos y proteínas totales. El daño a lípidos y proteínas se midió mediante la determinación de malonildialdehído y de los productos avanzados de



oxidación de proteínas respectivamente; en todos los casos se emplearon métodos espectrofotométricos. Las diferencias entre ambos grupos se analizaron mediante pruebas no paramétricas para un nivel de significación de un 95%. Se evidenció un aumento altamente significativo ($p=0,000$) de la glucemia y un aumento significativo del colesterol ($p=0,047$) y los triglicéridos ($p=0,012$) en los diabéticos, mientras que las proteínas totales se comportaron de manera similar en ambos grupos. Las concentraciones de malondialdehído y proteínas oxidadas aumentaron de manera muy significativa ($p=0,000$) en los enfermos. Se evidenció deficiencias en el control metabólico y daño oxidativo en los pacientes diabéticos tipo 1 incluidos en el estudio, dado por un aumento en la oxidación de lípidos y proteínas.

PALABRAS CLAVE: hiperglucemia, daño oxidativo.

THE HYPERGLYCEMIA AND THE DAMAGE TO LIPIDS AND PROTEINS

ABSTRACT

Significant structure and metabolism changes in lipids and proteins during diabetes mellitus have, in general, oxidative nature that's way it involve the development of vascular complications. To determine biochemical-clinic parameters and indicators of oxidative damage to lipids and proteins in type 1 diabetic patients. It was studied 100 serum samples; 40 from type 1 mellitus diabetes diagnosed patients that come from endocrinology surgery belong to "Centro de Atención al Paciente Diabético" of Villa Clara and 60 individuals used as control group. Biochemical-clinic studies involved glycemia, total cholesterol, triglycerides and total proteins. Lipids and proteins damage was measure assessing serum concentrations of malondialdehyde and advance products of proteins oxidation respectively. In all case it was used spectrophotometric methods. Differences between both groups were analyzed by non parametrical tests with

significance value of 95%. It was evidenced a high significant increase ($p=0,000$) of glycemia and a significant increase of cholesterol ($p=0,047$) and triglyceride ($p=0,012$) in diabetic patients whereas total proteins were similar in both groups. Malonildialdehyde concentrations and oxidized proteins increase in significant way ($p=0,000$) in diabetic patients. It was evidenced deficiency in metabolic control and oxidative damage in type 1 diabetic patients included in our study due to an increased of lipid and proteins oxidation.

KEY WORD: Hyperglycemia, oxidative damage.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa asociada a fallas en la acción o producción de la insulina que conlleva a alteraciones del metabolismo intermedio de carbohidratos, lípidos y proteínas. Específicamente la diabetes tipo 1 (DM1) se caracteriza en general, por una reacción de tipo autoinmune que se manifiesta por una destrucción selectiva de las células beta del páncreas productoras de insulina, cuya ausencia en el organismo conduce a la hiperglucemia crónica (1). Múltiples son los estudios que se realizan para desentrañar los mecanismos bioquímicos que permiten explicar la

alta prevalencia de DM, y a pesar que se ha demostrado la alta predisposición hereditaria a padecerla con la intervención de diversos factores ambientales, son varios los factores de riesgo que pueden asociarse.

El estrés oxidativo (EO) podría considerarse uno de estos factores, por estar involucrado en el mecanismo fisiopatológico de más de 100 enfermedades crónico-degenerativas, entre las que se encuentra la DM y sus complicaciones micro y macroangiopáticas (2). Se conoce que la alteración redox que conlleva al EO es propiciada por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies

reactivas y los antioxidantes, donde la balanza se inclina a favor de los primeros (3). Este desbalance trae consigo daño a nivel celular, tisular y sistémico que afecta la homeostasis del organismo (4). En condiciones de hiperglucemia las especies reactivas del oxígeno (ERO) se generan principalmente durante la autooxidación de la glucosa y en diferentes reacciones oxidativas (5) que acompañan a la glicación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las modificaciones de las proteínas inducidas por carbohidratos son producidas durante la hiperglucemia crónica y son causadas por la interacción de la glucosa y de otros carbohidratos —como la fructosa y la glucosa-6-fosfato o sus derivados— con las proteínas, ácidos nucleicos, y lípidos, para formar productos de glicación avanzada, conocidos como AGE o AGEs (6,7) (por sus siglas en inglés, *advanced glycation end products*). El EO está íntimamente vinculado a la glicación, por lo cual la acción combinada de estos dos procesos

se conoce como glucooxidación. Las ERO conducen también a modificaciones estructurales de las proteínas, originando compuestos en ocasiones similares a los productos de glicación. Además, los compuestos resultantes de la lipoperoxidación, como el malondialdehído, se pueden unir a las proteínas y amplificar el daño inducido por la glucooxidación. Las investigaciones realizadas en la DM han estado encaminadas por lo general a desentrañar los mecanismos que provocan las serias complicaciones en órganos y sistemas sensibles provocadas por la hiperglucemia. No obstante, cada resultado podría aportar elementos que logren explicar algunas de las causas y/o consecuencias de tales alteraciones. De manera que el objetivo principal de nuestro estudio fue determinar la existencia de daño oxidativo en macromoléculas importantes como los lípidos y proteínas, en una muestra de pacientes diabéticos tipo 1 que presentaron hiperglucemias.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el laboratorio de Química Sanguínea perteneciente a la Unidad de Investigaciones Biomédicas se realizó una investigación analítica transversal de casos y controles con el fin de determinar la existencia de daño oxidativo a lípidos y proteínas en pacientes aquejados de Diabetes mellitus tipo 1. Los individuos involucrados en el estudio fueron atendidos en el Centro de Atención y Educación al Paciente Diabético de la provincia de Villa Clara, durante el año 2014.

Se realizó un muestreo intencional partiendo de los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Grupo de estudio: Pacientes con criterio diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 1, mayores de 18 años y menores de 50, de ambos sexos y que otorgaron el consentimiento informado para la investigación.
- Grupo control: Individuos aparentemente sanos, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 18 y

50 años y que emitieron su consentimiento.

Criterios de exclusión

- Pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 que padecían de otra patología crónica que pudiera interferir en el análisis y que no dieron su consentimiento.
- Muestras de suero con interferentes analíticos como lipemia, ictericia o hemólisis.

Las determinaciones de los parámetros estudiados se realizaron en 100 muestras de suero: 40 de pacientes diabéticos tipo 1 y 60 de individuos aparentemente sanos provenientes de un estudio de pesquiasaje tomados como control.

Fueron empleados métodos espectrofotométricos (Genesys 10 UV®), con reactivos suministrados por la firma Merck KGaA 64271 Damstadt. Germany (www.merck.de) y de la HELFA Diagnosticos® Cuba (epbcjf@ip.minbas.cu).

Determinaciones

Para determinar el daño a lípidos o lipoperoxidación se realizó la técnica de

Malonildialdehído (MDA) la cual se basa en la reacción de dos moléculas del reactivo cromogénico N-metil-2-fenil indol con una molécula de MDA a 45 °C, lo que conduce a la formación de un cromóforo estable con un máximo de absorbancia a 586 nm (8). La concentración de MDA fue cuantificada mediante la utilización de una curva patrón de 1, 1, 3, 3 Tetramethoxypropan y expresada en μM .

Para determinar el daño a proteínas se cuantificaron los Productos Avanzados de Oxidación de Proteínas (PAOP) por el método de Witko-Sarsat (9), donde las proteínas susceptibles al daño por radicales libres dan lugar mediante reacciones de agregación, entrecruzamiento y fragmentación a los PAOP. La concentración de estos es expresada como equivalentes de Cloramina T (patrón) en condiciones acídicas a 340 nm en presencia de yoduro de potasio, siguiéndose la transformación de iones yodo a yodo diatómico que provocan estos PAOP. La concentración es expresada en μM .

Se cuantificaron además las proteínas totales por el método de Lowry (10) y por métodos hemoquímicos convencionales se determinó la glucemia, el colesterol total y los triglicéridos.

Análisis de Datos

Los resultados fueron procesados mediante hojas de cálculos en Excel y posteriormente las concentraciones fueron sometidas al programa estadístico SPSS versión 18 para Windows. A partir de una base de datos, se realizaron análisis descriptivos para las variables de estudio. Al aplicar pruebas de normalidad se comprobó que no existía una distribución gaussiana ($p < 0,05$) por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas para la comparación de medianas, específicamente el test de Mann-Whitney. En todos los casos se tuvo en cuenta un nivel de confiabilidad del 95 y 99 %.

Aspectos éticos

El protocolo de investigación fue valorado por el Comité Científico y aprobado por el Comité de Ética del centro. El estudio fue diseñado teniendo

en cuenta la Declaración de Helsinki (11) sobre los aspectos éticos para el trabajo en humanos. De esta forma todos los individuos incluidos, emitieron su autorización por escrito (12), respetándose el principio de autonomía.

RESULTADOS

La edad de los participantes involucrados en el estudio estuvo comprendida entre 18 y 50 años. Los pacientes diabéticos tipo 1 mostraron un promedio de 41,6 años y el grupo de individuos tomados como control presentó una edad promedio de 43,8 años. Se analizaron muestras de ambos sexos; en el grupo de diabéticos: 18 mujeres y 22 hombres y en el grupo control: 30 mujeres y 30 hombres. En ninguno de los casos se evidenció

diferencias entre los sexos por lo que la muestra se tomó como única permitiendo la comparación entre los grupos.

Las Tablas 1 y 2 muestran las comparaciones de las variables estudiadas en el grupo de pacientes diabéticos y grupo control, así como la significación obtenida.

La tabla 1 refleja las concentraciones de glucemia, colesterol, triglicéridos y proteínas totales en pacientes diabéticos y controles, donde se evidencia un aumento altamente significativo ($p < 0,01$) de la glucemia y un aumento significativo del colesterol total y triglicéridos en los diabéticos. Las proteínas totales se comportaron de manera similar en ambos grupos.

Tabla 1. Concentraciones de parámetros bioquímicos clínicos en diabéticos y controles

	Grupos de estudio	n	X ± DS	p
Glucemia (mmol/L)	Sanos	60	4,42 ± 1,12	0,000**
	Diabéticos	40	7,56 ± 1,96	
Colesterol	Sanos	60	5,71 ± 0,54	0,047*

(mmol/L)	Diabéticos	40	6,85 ± 1,32	
Triglicéridos (mmol/L)	Sanos	60	1,08 ± 0,21	0,012*
	Diabéticos	40	3,83 ± 1,35	
Proteínas Totales (g/L)	Sanos	60	43,8 ± 2,5	0,086
	Diabéticos	40	42,6 ± 3,2	

La tabla 2 expone las comparaciones de los parámetros de daño oxidativo estudiados. El MDA se usó como medida de la peroxidación lipídica y los PAOP como medida del daño a

proteínas. En ambos caso se produjo un aumento altamente significativo ($p < 0,01$) en los pacientes diabéticos, con respecto a los controles.

Tabla 2. Concentraciones de MDA y PAOP en sujetos diabéticos y controles

Grupos de estudio		n	X ± DS	p
MDA (μ M)	Sanos	60	1,17 ± 0,44	0,000**
	Diabéticos	40	3,58 ± 2,89	
PAOP (μ M)	Sanos	60	60,63 ± 19,38	0,000**
	Diabéticos	40	153,12 ± 95,38	

DISCUSIÓN

El EO presente en los sujetos diabéticos se asocia con la hiperglucemia crónica que caracteriza a esta enfermedad, ya que ante un exceso de glucosa circulante se activan varias vías

metabólicas no muy usuales en el organismo, lo que conduce a la generación de otros metabolitos entre los cuales se encuentran los radicales libres del oxígeno (13).

Los niveles elevados de marcadores de oxidación asociados con el control glucémico y los AGEs confirman la vinculación entre la hiperglucemia crónica y el EO (6). Aunque también los bajos niveles de insulina se han asociado a este estado, ya que se ha demostrado que las células beta del páncreas no son inmunes al daño por los RL (7). De manera que una vez instaurada la enfermedad es posible que empeore la situación del sujeto diabético, dado que disminuye la secreción de insulina en el páncreas por interferencia de los RL sobre el proceso normal de producción y secreción de insulina. Los cambios significativos en la estructura y metabolismo de los lípidos y proteínas en la DM por lo general, son de naturaleza oxidativa. La oxidación de los lípidos y lipoproteínas del plasma en las membranas celulares están asociados con el desarrollo de complicaciones vasculares en la diabetes. Sin embargo, estudios epidemiológicos sugieren que los niveles de peroxidación de lípidos en el

plasma humano están más asociados con hipertrigliceridemia y enfermedades vasculares que con la diabetes directamente (14).

En un estudio realizado en ratas diabéticas, la peroxidación lipídica incrementada fue también asociada con hipertrigliceridemia, pero la oxidación y la toxicidad resultante de las lipoproteínas oxidadas fueron inhibidas por la administración de un antioxidante lipofílico sin ningún efecto en la hiperlipidemia (15).

El incremento de lípidos peroxidados en el plasma podría resultar de la activación de procesos enzimáticos por inflamación vascular generalizada que por consiguiente conduce al incremento en los niveles de prostaglandinas y productos lipooxygenados. Alternativamente, los lípidos peroxidados podrían ser formados por reacciones no enzimáticas de lípidos insaturados con radical superóxido, peróxido de hidrógeno, e iones metálicos fortuitos en la circulación, el espacio extravascular o en la superficie

del endotelio y las células fagocíticas (16,17).

La distinción entre la oxidación enzimática y no enzimática de los lípidos *in vivo* no es absoluta. De este modo, la síntesis enzimática de prostaglandinas puede ser estimulada por lípidos peroxidados derivados desde vías no enzimáticas, y los lípidos peroxidados generados enzimáticamente pueden también reaccionar con iones metálicos para iniciar reacciones de auto-oxidación. El peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, intermediarios de la vía auto-oxidativa, son también producidos por ambas vías (enzimáticas y no enzimáticas) (18,19).

Por otro lado las complicaciones de la diabetes inducida por la hiperglucemia se originan en gran medida por cambios químicos y funcionales de las proteínas, alteración en la expresión de los genes y daño del endotelio. Al parecer la disfunción del endotelio es la causa principal de las complicaciones vasculares (20), porque en este tejido se presenta un desequilibrio en la

producción de sustancias vasoactivas, que consiste en la disminución de la producción de vasodilatadores como el óxido nítrico, y en el aumento de la liberación de vasoconstrictores como la endotelina-1 (ET-1). Asimismo, hay aumento en la liberación de factores procoagulantes. En conjunto estas alteraciones pueden explicar, en parte, la mayor incidencia de aterosclerosis e hipertensión en este tipo de pacientes. Pero además, en el endotelio y en otras células se incrementa la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), de proteínas de la matriz extracelular, citocinas y factores del crecimiento [entre los que se encuentran: el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α)] (21). Lo anterior provoca alteraciones celulares y orgánicas, dependiendo del lugar donde se producen.

La glicosilación no enzimática también puede afectar la funcionalidad de las

células, ya que afecta la actividad biológica de las proteínas por medio de tres mecanismos generales: la modificación de proteínas extracelulares (de bajo recambio), el desencadenamiento de procesos intracelulares por unión a receptores extracelulares y alteraciones de proteínas intracelulares (22). En los sujetos diabéticos, donde se conjuntan las condiciones para que se generen los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), se ha descrito la unión de éstos a receptores específicos del tipo de las gammaglobulinas, en la superficie celular de macrófagos, monocitos y células endoteliales, desencadenando la liberación de RL de oxígeno y EO (23).

En general, los estudios de peroxidación lipídica son consistentes con los estudios de glicosilación de proteínas en la diabetes (24). De manera que el incremento en la oxidación tanto de lípidos como de proteínas está asociado con el desarrollo de complicaciones.

El daño por peroxidación lipídica puede no estar limitado al compartimiento de los lípidos porque los lípidos peroxidados pueden causar coloración y entrecruzamiento de colágeno y contribuir al desarrollo de fluorescencia en las proteínas del plasma en la diabetes (24). Este cruzamiento entre la química oxidativa y los lípidos y proteínas plantea que la glicación de proteínas causa oxidación de los lípidos asociados y aumentan la generación de fluorescencia durante la oxidación de proteínas (25).

De este modo, se considera que la glicación incrementada del colágeno y las proteínas del plasma en la diabetes pueden estimular la oxidación de lípidos, los cuales pueden cambiar las reacciones autoxidativas de azúcar, aumentando el daño tanto en lípidos como en proteínas en la circulación y la pared vascular, continuando y reforzando el ciclo de estrés oxidativo y daño.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo del proyecto PROCDEC en recursos materiales que permitieron la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. American Diabetes Association. Executive summary: Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care* 2012; 35(1): 4–10.
2. Suziy de MB, Lucas José SF, Glaucévane SG, Luíza AR, Marília OFG, Sandra ML, et al. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 3265-3284.
3. Maldonado-Saavedra O, Jiménez-Vázquez EN, Guapillo-Vargas MRB. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV* 2010. Disponible en: http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf.
4. Orasanu G, Plutzky J. The pathologic continuum of diabetes vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53 (5): 35.
5. Anabela RP, Carlos PM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycaemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 212: 167-78.
6. Nessar A. Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 67: 3-21.
7. Houstis N, Evan D, Rosen, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440: 944-8.
8. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol* 1990; 186: 407 – 421.
9. Witko-Sarsat V, Friedlander M. Advanced oxidation protein products as novel mediators of

- inflammation and monocytes activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
11. Manzini JL. Declaración de Helsinki: Principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. Análisis de la 5° Reforma, aprobada por la Asamblea general de la Asociación Médica Mundial en octubre del año 2000 en Edimburgo. En: Lolas F, Quezada A, (eds.). Pautas éticas de investigación en sujetos humanos: nuevas perspectivas. Chile: Serie Publicaciones 2003: 21-34.
12. Rodríguez E. El consentimiento informado en el uso de muestras biológicas humanas y de registros médicos. En: Lolas F, Quezada A, (eds.) Pautas éticas de investigación en sujetos humanos: nuevas perspectivas. Santiago de Chile: Programa Regional de Bioética OPS/OMS 2003: 45-55.
13. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39 (1): 44-84.
14. Bigagli E, Raimondi L, Mannucci E, Colombi C, Bardini G, Rotella CM, et al. Lipid and protein oxidation products, antioxidant status and vascular complications in poorly controlled type 2 diabetes. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease* 2012; 12: 33-39.
15. Kowluru RA, Abbas SN, Odenbach S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy. Effect of reinstatement of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *J Diabet Complications* 2004; 18: 282-288.
16. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Domínguez C. Estimation of lipoperoxidative

- damage and antioxidant status in diabetic children: relationship with individual antioxidants. *Free Radic Res* 2005; 39: 933-942.
17. Ozkul A, Ayhan M, Yenisey C, Akyol A, Guney E, Ergin FA. The role of oxidative stress and endothelial injury in diabetic neuropathy and neuropathic pain. *Neuro Endocrinol Lett* 2010; 31(2): 261-4.
18. Emina Čolak. New markers of oxidative damage to macromolecules. *JMB* 2008; 27: 1-16.
19. Marra G, Cotroneo P, Pitocco D, Manto A, Di Leo M, Ruotolo V, et al. Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 370-375.
20. Navarro-Gonzalez J, Mora-Fernandez C, Gomez-Chinchon M, Muros M, Herrera H, Garcia J. Serum and gene expression profile of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in hypertensive diabetic patients: effect of amlodipine administration. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23(1): 51-9.
21. Lau YS, Tian XY, Huang Y, Murugan D, Achike FI, Mustafa MR. Boldine protects endothelial function in hyperglycemia-induced oxidative stress through an antioxidant mechanism. *Biochem Pharmacol* 2013; 85: 367-75.
22. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc* 2000; 100: 621-633.
23. Kalousová M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51: 597-604.
24. Erciyas F, Taneli F, Arslan B, Zulu Y. Glycemic control, oxidative stress, and lipid profile in children with type 1 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 2004; 35: 134-140.



25. Rosado Pérez J, Mendoza Núñez VM. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquimia* 2007; 32 (2): 58-69.