
RELACIÓN ENTRE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA, ANTIOXIDANTES TOTALES Y LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) Y GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 CONTROLADOS Y NO CONTROLADOS EN BOGOTÁ

M. Guerra¹, M. Avarado², D. Librado³, A. Torres¹

¹ Departamento de Nutrición y Bioquímica. Bioquímica Clínica. Grupo de investigación: Clínico-Genético-Molecular en Dislipoproteinemias

² Departamento de Matemáticas

³ Carrera de Bacteriología

Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª N° 43-82. Bogotá, Colombia
mguerra@javeriana.edu.co

RESUMEN

Los diabéticos exhiben alta actividad de radicales libres, originando intermediarios químicos altamente reactivos y tóxicos. La protección contra el daño producido por éstos, es dada por la acción del sistema antioxidante mediante las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) las cuales detoxifican e impiden oxidaciones biológicas.

La muestra incluyó 60 individuos (40-80 años) controles (n=20), diabéticos controlados (n=20) y no controlados (n=20). Los criterios indicativos del buen control de la diabetes: porcentaje de hemoglobina glicosilada (< 7%), TA \leq 130/85 mmHg y glicemia basal (<140 mg/dL). Mediante la prueba t de diferencia de medias suponiendo varianzas desiguales se compararon los grupos.

El porcentaje de HbA1c fue significativamente elevado ($p < 0,05$) en los diabéticos no controlados ($X=10,8\%$) comparado con los controlados ($X= 6,2\%$). Al confrontar los resultados de la actividad de las enzimas SOD y GPx de los sanos (SOD: $X=198 \pm 24$; GPx: $X=6595 \pm 1225$) con los diabéticos controlados (SOD: $X=140 \pm 7$; GPx $X=3184 \pm 222$) y los no controlados (SOD: $X=127 \pm 17$; GPx $X=2580 \pm 682$) se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), los no controlados mostraron las actividades más bajas. De la misma manera, la comparación de las actividades enzimáticas entre diabéticos controlados y no controlados mostró actividades significativamente ($p < 0,05$) más bajas en los no controlados.

La baja actividad de las enzimas SOD y GPx en los no controlados puede ser reflejo de incrementos de RLO y predisposición a desarrollar fenómenos que conducen a complicaciones macrovasculares.

Palabras clave: antioxidantes, diabetes, glutatión peroxidasa, hemoglobina glicosilada, radicales libres de oxígeno, superóxido dismutasa.

ABSTRACT

Diabetics exhibit a high level of free radical activity, producing highly reactive and toxic chemicals as intermediate metabolites. Protection against damage by these chemicals is provided by the anti-oxidant system, especially the enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), which detoxify and prevent biological oxidations.

The sample included 60 individuals (40-80 years old) in three groups: (1) control group (n=20), (2) controlled diabetics (n=20) and (3) uncontrolled (n=20). The indicative criteria that the diabetes was well under control were: percentage of glycosylated hemoglobin (< 7%), TA \leq 130/85 mmHg and basal glycemia (< 140 mg/dL). The groups were compared by means of the t test for the difference in means supposing unequal variances.

The percentage of HbA1c was significantly elevated ($p < 0,05$) in the subjects with uncontrolled diabetes ($X=10,8\%$) in contrast with those whose diabetes was under control ($X = 6,2\%$). When comparing the results of the activity of the enzymes in the healthy subjects (SOD: $X=198 \pm 24$; GPx: $X=6595 \pm 1225$) with those from the controlled diabetics (SOD: $X=140 \pm 7$; GPx $X=3184 \pm 222$) and the uncontrolled diabetics (SOD: $X=127 \pm 17$; GPx $X=2580 \pm 682$), significant differences ($p < 0,05$) were observed. Healthy subjects showed higher activities. Comparison of the enzyme activities between the controlled and uncontrolled groups also showed significant differences ($p < 0,05$). The uncontrolled group showed significantly lower ($p < 0,05$) activities.

The drop in the activity of the enzymes SOD and GPx in the uncontrolled diabetics could reflect increases in RLO levels and a predisposition to develop the conditions that would lead to macrovascular complications.

Key words: antioxidant status, diabetes, free oxygen radicals, glutathione peroxidase, glycosylated hemoglobin, superoxide dismutase.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una condición metabólica de incidencia creciente, caracterizada por disfunción en la homeostasis de la glucosa, con hiperglicemia crónica por inmunodeficiencia absoluta o relativa. La enfermedad es progresiva y asociada con alto riesgo de desarrollar compromiso vascular (Taylor, 1995).

Recientemente, se ha postulado que la hiperglicemia sostenida favorece la autooxidación de la glucosa por disminución del óxido nítrico (uno de los principales agentes vasodilatadores y antiagregantes en el organismo), lo cual causaría desbalance en los mecanismos de oxidación y antioxidación que conllevaría a hiperproducción de radicales libres de oxígeno (RLO), ocasionando disturbios en la mecánica metabólica de muchos tejidos, células endoteliales membranales, apoptosis de las

células β de los islotes de Langerhans que originan la insulina, oxidación de las lipoproteínas de baja densidad e inactividad de vitaminas antioxidantes, lo que favorece la generación de radicales libres, y conlleva a fenómenos aterogénicos, hipertensión y microangiopatía diabética (Bierman, 1992; Cameron *et al.*, 1995). La glucotoxicidad es responsable de manifestaciones tardías en la diabetes debido a la glicosilación no enzimática de proteínas y/o enzimas importantes en los procesos de eliminación de radicales libres tales como la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa, a la generación exagerada de polioles y a la alteración del índice oxidación/antioxidación (producción excesiva de radicales libres) (Brownlee, 1995).

Los sujetos con diabetes tienen una alta actividad de RLO (Wolff 1993). Estas moléculas que contienen uno o más electrones

desapareados se originan cuando el oxígeno (O_2) se reduce de manera incompleta formando intermediarios químicos altamente reactivos y tóxicos como el anión superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo (OH^\cdot) (Fridovich, 1994). Los radicales libres se producen continuamente en la mitocondria mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y en otro tipo de reacciones. Cuando el oxígeno se reduce de manera incompleta, se forman especies tóxicas como el anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último, en presencia de hierro (Fe^{2+}) u otros metales reducidos de transición, genera radicales hidroxilo (OH^\cdot) altamente reactivos. Las especies reactivas de oxígeno oxidan lípidos (peroxidación de lípidos), proteínas que causan lesiones en las membranas, inactivación enzimática y cortes en la doble cadena del DNA (Haffner, 2000; Richter *et al.*, 1988).

La protección contra el daño causado por RLO es dada por la acción del sistema antioxidante que consta de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa. Estas enzimas detoxifican al superóxido y al peróxido de hidrógeno para impedir oxidaciones biológicas indeseables (Harris, 1992; Matés *et al.*, 1999).

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (diabetes mellitus no insulino dependiente, DMNID), que exhiben control deficiente de la glicemia tienen una actividad antioxidante total disminuida, esto induce a defectos en la protección contra los RLO y a susceptibilidad al daño oxidativo (Maxwell *et al.*, 1997). Por tanto, se considera de importancia la medición del estado antioxidante total en sujetos con diabetes mellitus tipo 2, ya que es un reflejo de los niveles de radicales libres, con el objeto de permitir instaurar medidas terapéuticas que conlleven a mejor calidad de vida de los individuos con esta entidad.

METODOLOGÍA

El estudio se realizó en pacientes adultos con diabetes mellitus tipo 2 seleccionados en la Asociación Colombiana de Diabetes en Bogotá D.C. (previa aprobación del Comité de Bioética), para lo cual se aplicó una encuesta a cada individuo en donde se indagó acerca de los antecedentes médicos, personales y familiares y, hábitos tales como el tabaquismo, sedentarismo, etc.; se les comunicó acerca de las características e importancia del estudio y se obtuvo su consentimiento por escrito, el cual, sigue las directrices establecidas por la legislación colombiana (Londoño *et al.*, 1993). La selección buscó una distribución homogénea de pacientes con condiciones socioeconómicas similares y se excluyeron aquellos individuos con patologías diferentes de diabetes e hipertensión.

Los sujetos se agruparon en tres categorías: 1. diabéticos que mostraron buen control metabólico, (hemoglobina glicosilada menor de 7%); 2. diabéticos no controlados (hemoglobina glicosilada mayor de 7%); 3. individuos saludables.

Las condiciones preanalíticas fueron las recomendadas mundialmente para este tipo de determinaciones. La muestra se obtuvo mediante venopunción directa con agujas múltiples utilizando tubos con anticoagulantes EDTA y heparina a una concentración final de 1mg/mL (Vacutainer). La sangre se centrifugó a 3.000 rpm por 15 minutos para obtener glóbulos rojos y plasma.

La concentración porcentual de hemoglobina glicosilada, se obtuvo mediante el método de inhibición de la inmunoaglutinación de partículas de látex recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico (Bayer S.A.), y la hemoglobina por el método de cianometahemoglobina, en donde la Hb es oxidada a metahemoglobina por el ferrocianuro.

nuro potásico el cual es convertido a cianometahemoglobina por el cianuro potásico.

A partir de los eritrocitos se determinó la actividad de la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa con los kits Ransel y Ransod (RS504 y SD125, Randox Laboratories Ltd. U.K.) y el estado antioxidante total en plasma heparinizado (NX2332, Randox Laboratories Ltd. U.K.). Estos analitos se valoraron por los métodos ideados por Miller *et al.*, (1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pacientes pobremente controlados (hemoglobina A1c mayor de 7%) exhiben aumento en la actividad de los radicales libres y disminución del estado antioxidante total en comparación con los diabéticos metabólicamente controlados y con los controles no diabéticos (pacientes saludables).

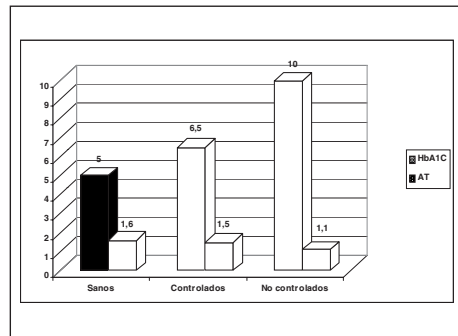
Debido a que la vida media de los radicales libres es de fracción de segundos, su cuantificación es sumamente difícil y requiere de tecnología muy compleja, por lo que se valoró la capacidad antioxidante total que involucra la suma de los antioxidantes presentes en el organismo, capaces de inactivar y depurar los radicales libres de oxígeno de diferentes orígenes. La estimación de AT refleja el equilibrio dinámico entre el sistema antioxidante y la producción de especies reactivas de oxígeno (Haffner, 2000).

La tabla 1 y la gráfica 1 muestran el comportamiento de la hemoglobina glicosilada y el estado antioxidante total de los sujetos en estudio, en donde puede apreciarse cómo los individuos con HbA1c dentro de los valores de referencia, exhiben normalidad en AT, en contraste con los diabéticos no controlados, lo que llevaría a pensar cómo el buen control metabólico puede predecir la protección existente contra radicales libres.

Tabla 1

Promedio y desviación estándar del % de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y de antioxidantes totales (AT), de pacientes sanos, diabéticos tipo 2 controlados y no controlados en Bogotá D.C.

| | HbA1c (%) | | Antioxidantes totales | |
|---------------------|-----------|-------|-----------------------|-------|
| | \bar{X} | S | \bar{X} | S |
| Pacientes sanos | 5,0 | ± 0,6 | 1,6 | ± 0,1 |
| Controlados | 6,5 | ± 0,4 | 1,5 | ± 0,3 |
| No controlados | 10,0 | ± 1,9 | 1,1 | ± 0,1 |
| Valor de referencia | < 7 | | 1,3 – 1,77 | |



Gráfica 1. Promedio del % de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y de antioxidantes totales (AT) de pacientes sanos, diabéticos tipo 2 controlados y no controlados en Bogotá D.C.

Para tener una mejor visión del comportamiento tanto de la hemoglobina glicosilada como de los antioxidantes totales se construyeron los intervalos de confianza para estos parámetros encontrando que con el 95% de confianza se puede afirmar que la hemoglobina glicosilada en pacientes sanos fluctúa entre 4,67 y 5,32; para diabéticos controlados oscila entre 6,28 y 6,71 y para los no controlados entre 8,96 y 11,03.

Se puede notar que no existe una relación de inclusión en estos intervalos, en este caso, todos los intervalos son excluyentes. Esto permite evidenciar las diferencias significativas entre los tres grupos. La ausencia de la relación de in-

clusión puede advertirse al ubicar los intervalos de confianza en la recta real.

4,67 5,32 6,28 6,71 8,96 11,03

Es importante recordar que la comparación de estos intervalos es una forma equivalente de determinar las diferencias significativas entre los tres grupos. Para corroborar estos resultados también se realizó el análisis de varianza para los grupos en estudio y se confirmaron las diferencias significativas en por lo menos dos de ellos ($p < 0,05$).

Con respecto a los radicales libres, los intervalos de confianza del 95% son los siguientes:

[1,54, 1,65] para pacientes sanos
 [1,33, 1,66] para pacientes controlados
 [1,04, 1,15] para pacientes no controlados

Al observar los intervalos de confianza se encuentra un traslape entre los intervalos para los pacientes sanos y controlados. Estos intervalos se hallan incluidos dentro del rango de referencia. Con respecto a los pacientes no controlados, el intervalo de confianza está totalmente por fuera y a la izquierda del rango considerado normal. Por lo tanto, el grupo que está marcando la diferencia, en el caso de los radicales libres, es el grupo de pacientes no controlados.

1,04 1,15 1,33 1,54 1,65 1,66

Con el fin de evitar los efectos deletéreos de los RLO (oxidación de biomoléculas, daño tisular y muerte celular), las células deben desarrollar mecanismos antioxidantes importantes como defensa para

evitar la producción de estos radicales, o para limitar su capacidad de lesión. Tales mecanismos incluyen enzimas que descomponen los peróxidos (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa), las proteínas que se combinan con los metales de transición, y una cantidad importante de compuestos, los cuales depuran la actividad de los radicales libres. (Céspedes y Sánchez, 2000).

La tabla 2 muestra el promedio y la desviación estándar de las enzimas SOD y GPx de los individuos en estudio. En ella se observa, cómo los controlados muestran actividad dentro de las cifras de referencia en comparación con los no controlados, lo que está en concordancia con el estado antioxidante, por la posible glicosilación no enzimática de proteínas, lo cual puede afectar los radicales libres de oxígeno (RLO) favoreciendo la autoxidación de la glucosa, con formación de enediones y radical libre hidroxilo (el más potente agente oxidante conocido). Como respuesta a la hiperglicemia existe incremento de RLO por aumento de NADH/NAD que se traduce en estado pseudohipóxico celular, por lo cual, la actividad de las enzimas en estudio guarda relación directa con el buen control metabólico de los pacientes.

Teniendo en cuenta que las enzimas en estudio se hallan en el citosol, se realizó un hemolizado de las muestras para poder valorar su actividad (U/L), así como su comparación con la concentración de la hemoglobina (U/gHb) de los pacientes, encontrándose una correlación directa.

Con la misma técnica usada en el caso de los antioxidantes totales, se generaron los intervalos de confianza del 95% para cada parámetro considerado. Estos intervalos son:

Tabla 2

Promedio y desviación estándar de superóxido dismutasa (SOD) U/gHb, de glutatión peroxidasa (GPx) y de U/gHb de pacientes sanos, diabéticos tipo 2 controlados y no controlados en Bogotá D.C.

| | SOD (U/L) | | U/gHb | | GPx (U/L) | | U/gHb | |
|---------------------|-----------|--------|-------------|--------|--------------|---------|-------------|--------|
| | X | S | X | S | X | S | X | S |
| Pacientes sanos | 219,5 | ± 27,8 | 1453,9 | ±238,3 | 5871,6 | ±1572,6 | 39,2 | ± 8,8 |
| Controlados | 204,7 | ± 31,8 | 1393,5 | ±243,3 | 5649,9 | ±1474,1 | 38,6 | ± 10,6 |
| No controlados | 118,3 | ± 41,5 | 814,4 | ±332,0 | 3420,6 | ±1321,4 | 23,2 | ± 8,9 |
| Valor de referencia | 164 - 240 | | 1092 - 1817 | | 4171 - 10881 | | 27,5 - 73,6 | |

Para superóxido dismutasa:

[204,37, 204,62] en pacientes sanos
 [187,39, 222,00] en pacientes controlados
 [95,72, 140,87] en pacientes no controlados

En este caso, la diferencia está marcada por los pacientes no controlados, cuyos valores de superóxido dismutasa están en un intervalo que se ubica a la izquierda del rango de valores normales.

Para GPx:

[5135,58, 6607,61] en pacientes sanos
 [4959,98, 6339,81] en pacientes controlados
 [2802,16, 4039,03] en pacientes no controlados

Al observar estos intervalos de confianza se puede notar que el correspondiente a los pacientes no controlados está por fuera y a la izquierda del correspondiente a los valores de referencia.

CONCLUSIONES

Los diabéticos tipo 2 exhiben alta actividad de radicales libres de oxígeno.

Los pacientes con diabetes mellitas tipo 2 no controlados exhiben actividad de SOD y de GPx y de antioxidantes totales menores que los pacientes controlados.

La baja actividad de las enzimas SOD y Gpx y de antioxidantes totales, encontrada en los pacientes no controlados puede ser reflejo de incrementos de RLO y predisposición a desarrollar fenómenos que conducen a complicaciones macrovasculares.

La de SOD y de GPx y de antioxidantes totales guardan relación directa con respecto al buen control metabólico de la diabetes.

El comportamiento de los antioxidantes totales, de la SOD y de la GPx, en los diabéticos estudiados, es similar a los publicados en otras latitudes y por diversos investigadores.

LITERATURA CITADA

BIERMAN, E.L. 1992. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb*, 12: 647-656.
 BROWNLEE, M. 1995. The pathological implications of protein glycation *Clin Inves Med*, 18: 275-228.
 CAMERON, N.E.; COTTER, M.A. 1995. Neurovascular dysfunction in diabetic rats. Potential contribution of autoxidation an free radicals examined using transition metal chelating agents. *J Clin Invest*, 96: 1159-1163.
 CÉSPEDES, T.; SÁNCHEZ, D. 2000. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el

- estado antioxidante y la terapia de suplementación, *Rev. Cubana Cardiol*, 14 (1): 55-60.
- FRIDOVICH I. 1994. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Ann Rev Biochem*, 64: 97-112.
- HAFFNER, S.M. 2000. Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism*, 49:30-34.
- HARRIS, E. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J*. 6: 2675-2683.
- LONDOÑO DE LA CUESTA, J.L.; ALVARADO, E.J.; CASA, J.V.; ROSELLI, D.A., 1993. Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud resolución N° 008430 de 1993. Ministerio de Salud, Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico, Santa Fe de Bogotá, D.C.
- MAXWELL, S.R.; THOMASON, H.; SANDLER, D. *et al.* 1997. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem*, 34: 638-644.
- MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32: 595-603.
- MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIS, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407-412.
- RICHTER, C.; PARK, J.W.; AMES, B.N. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 85: 6465.
- TAYLOR, S.I. 1995. Diabetes mellitus. En: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (eds.). *The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Diseases*. 7e ed., McGraw-Hill, N.Y. 843-893.
- WOLFF, S.P. 1993. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull*, 49: 642-652.

Recibido: 21-05-2005
Aceptado: 12-09-2005

