

R. 19188

UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

TD
P/90

X

MARCADORES BIOQUÍMICOS EN LA DIABETES MELLITUS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Queda registrada, como Tesis Doctoral
al folio 149 número 101 del libro
correspondiente.

Depositado en
de la
de esta Universidad desde el día
hasta el día

Sevilla, 11 de mayo de 1993

Sevilla 14 de mayo de 1993

El Jefe del Negociado de Tesis,

EL DIRECTOR DE

Leonor Prieto

Fra. Luis

Tesis presentada para optar al grado
de Doctor en Medicina y Cirugía
por Leonor Prieto-Carreño Candau.

Sevilla 1993

Leonor Prieto - C. Candau



MARCADORES BIOQUÍMICOS EN LA DIABETES MELLITUS

Leonor Prieto-Carreño Candau

Director: Francisco Sobrino Beneyto.
Prof. Titular del Departamento de
Bioquímica Médica y Biología
Molecular de la Universidad de
Sevilla

Fra. Sobrino

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento, a todos los que han facilitado la realización de este trabajo y de forma especial:

Al Profesor Francisco Sobrino, Titular del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, director de esta tesis por su orientación, enseñanza y constante ayuda.

Al Profesor Raimundo Goberna, Catedrático de Bioquímica Médica y Biología Molecular de esta Facultad, por su acogida en el departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena.

A Andrés Candau, por su contribución en la elaboración informática de la presente tesis.

A Manolo Conde, Regla Bustos, Mariló Chiara y Victoria Rodríguez por la cooperación y ayuda prestada en la obtención de muestras.

A todo el personal del departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena, por su colaboración y ayuda prestada.

A Rosario Membrives, por todo.

A mi Hija
A Luis y a Juan Ramón
A mis padres

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Metabolismo del hematíe	1
1.1 Glucólisis	1
1.2 Vía de las pentosas	3
1.3 Transporte de oxígeno y 2,3-DPG	4
1.4 Ruta de los polioles	6
1.4.1 Aldosa reductasa	7
1.4.2 Sorbitol deshidrogenasa	8
1.4.3 Distribución en los tejidos	9
1.4.4 Inhibidores de la aldosa reductasa	10
2. Papel de la acetilcolinesterasa en la diabetes	10
3. Bases bioquímicas de las complicaciones de la diabetes	12
3.1 En las células sanguíneas.	15
3.1.1 Alteraciones en la membrana celular	15
3.1.2 Alteraciones metabólicas en el eritrocito: papel de la ruta de los polioles en las complicaciones de la diabetes	17
4. Microalbuminuria	18
5. Glicosilación de las proteínas	22
5.1 Hemoglobina glicosilada	22
5.2 Fructosamina	24
6. Transferrina en la diabetes	26
7. Carácter inmunológico de la diabetes	28
II. OBJETIVOS	33
III. MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. Reactivos	35
2. Animales	35
3. Humanos	36
4. Muestras analizadas	36
4.1 Hemolizado de hematíes	36
4.2 Suero	37
4.3 Homogenado de tejidos	37
4.4 Orina	37
5. Experimentos in vitro	37
6. Método de análisis	38

6.1	Determinación de proteínas	38
6.2	Actividades enzimáticas	38
6.2.1	Aldosa reductasa	38
6.2.2	Acetil colinesterasa	39
6.3	Glucosa Peroxidasa	40
6.4	Fructosamina	42
6.5	Microalbuminuria	43
6.6	Transferrina	45
6.7	Anticuerpos antiinsulina	47
IV.	RESULTADOS	51
1.	Relaciones de la fructosamina con otros parámetros en la diabetes tipo II	51
1.1	Fructosamina, Hb Alc y glucemia basal	51
1.2	Fructosamina y proteínas totales del suero	57
1.3	Fructosamina y microalbuminuria	57
1.4	Fructosamina, triglicéridos y colesterol	63
2.	Transferrina en la diabetes clínica.	70
2.1	En la diabetes sin otras patologías asociadas	70
2.2	En la diabetes con alteraciones hepáticas y lipídicas asociadas	74
3.	Ac. Antiinsulina en la diabetes tipo I	77
4.	Actividad aldosa reductasa en hematíes y tejidos	78
4.1	Efecto de la concentración del sustrato y de la concentración del enzima sobre la actividad enzimática	78
4.2	Efecto de la diabetes clínica en hematíes humanos	83
4.3	Efecto de la diabetes inducida experimentalmente en hematíes de ratas	84
4.4	Efecto del estado prediabético inducido en diferentes tejidos de ratones	85
5.	Actividad acetilcolinesterasa en la diabetes	87
5.1	Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática	87
5.2	Efecto del ac. β -hidroxi-butírico, in vitro, sobre la actividad enzimática en hematíes	87
5.3	Efecto de la diabetes experimental en hematíes de ratas y ratones	88
5.4	Efecto de la pre-diabetes experimental en hematíes de ratones	94
5.5	Efecto de la diabetes clínica en hematíes	95

V. DISCUSIÓN	96
VI. CONCLUSIONES	104
VII. BIBLIOGRAFÍA	108

I INTRODUCCIÓN

1. METABOLISMO DEL HEMATÍE

1.1 GLUCOLISIS

El eritrocito maduro es una de las organizaciones bioquímicas menos complicadas de las células del cuerpo. No tiene núcleo, ni retículo endoplásmico, ni mitocondrias y es incapaz de sintetizar ac. nucleicos y proteínas careciendo de ciclo de Krebs y sistema transportador de electrones.

Está compuesto por dos unidades interdependientes: membrana y citoplasma. El citoplasma contiene hemoglobina como elemento mas abundante y está equipado con todos los enzimas de la glucolisis, ya que el eritrocito maduro depende enteramente de la ruta de Embden-Meyerhof como sistema energético.

La membrana, que aún no está bien definida, posee dos tipos de actividades ATP-asa, una de estas utiliza parte de la energía producida en el citoplasma para mantener el equilibrio osmótico (1).

En 1854, Pavy, señaló como la glucosa desaparecía rápidamente de la sangre después de su extracción al mismo tiempo que se acidificaba. Lepine (1890) da a este hecho el nombre de glucolisis (2).

La desaparición de la glucosa en el eritrocito es un proceso prácticamente anaerobio cuya etapa final es la formación de ac. láctico.

La glucolisis emprende la vía clásica de Embden-Meyerhof, sin embargo, puesto que se forma menos ac. láctico que glucosa desaparece, es necesario admitir la participación de una 2ª vía, la vía oxidativa de las pentosas fosfatos.

Vía de Embden-Meyerhof

Cerca del 95% de la glucosa consumida por el eritrocito, es metabolizada por la vía de Embden-Meyerhof.

La glucosa es catabolizada anaeróbicamente hasta

ac.láctico. Esta vía proporciona energía en forma de ATP, el balance neto es de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa consumida (1).

El grado de utilización de la glucosa está limitado, en gran parte, por las reacciones de la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa. Las dos enzimas catalizadoras de estas reacciones tienen un pH óptimo relativamente alto. A pH inferiores a 7, tienen escasa actividad. (2)

Por esta razón, la glucólisis intraeritrocitaria es muy sensible al pH y es estimulada por una elevación de éste. No obstante, a niveles de pH superiores a los fisiológicos, la estimulación de la actividad de las hexoquinasas y fosfofructoquinasas se traduce por la acumulación de fructosa difosfato y triosas fosfatos, porque la reacción de la gliceraldehído fosfato-deshidrogenasa se convierte en factor limitante. (1)

Las derivaciones metabólicas después de la formación de 1,3-DPG, proporcionan al eritrocito flexibilidad en relación a la cantidad de ATP que se forma en el metabolismo de cada molécula de glucosa.

El 1,3-DPG se puede metabolizar a 2,3-DPG mediante el consumo de los enlaces fosfatos de alta energía en la posición 1 del glicerato.

El traslado del grupo fosfato a la posición 2 por la difosfoglicerato-fosfatasa produce la formación del 3-fosfoglicerato.

Por otra parte, el 3-fosfoglicerato se puede formar directamente del 1,3-DPG, a través del paso de la fosfogliceratoquinasa, que ocasiona la fosforilación de 1 mol de ADP a ATP.

La glucosa, que se canaliza a través del paso 2,3-DPG, se metaboliza sin una ganancia neta de enlaces fosfatos, en forma de ATP, mientras que la glucosa, que sufre el paso de la fosfogliceratoquinasa, origina la formación de dos moléculas de ATP.

La regulación del flujo, en este punto de la rama determina

el grado de fosforilación del ADP a ATP y la concentración del 2,3-DPG, que es un importante regulador de la afinidad de la Hb por el oxígeno(3).

La concentración del 2,3-DPG depende del equilibrio existente entre su grado de formación a partir del 1,3-DPG mediado por la difosfoglicero-mutasa y su degradación por la difosfoglicerato-fosfatasa.(2,3)

Los hidrogeniones inhiben la reacción de la gliceromutasa y estimulan la reacción de la fosfatasa. Así, los niveles de 2,3-DPG del eritrocito son exquisitamente sensibles al pH; la elevación del pH causa también elevación de los niveles de 2,3-DPG, mientras que, la acidosis provoca una deplección del 2,3-DPG (4).

El metabolismo de la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof produce también energía reducida en la forma de NADH que es el cofactor principal de la metahemoglobina reductasa, enzima encargada de mantener el átomo de hierro de la Hb en estado ferroso.

La reducción de NAD⁺ a NADH sucede en el paso de la gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa. Si se oxida de nuevo el NADH al pasar la metaHb reducida a Hb, el producto final del metabolismo de la glucosa es el piruvato.

Sin embargo, si el NADH no se reoxida por la metaHb, el piruvato se reduce en el paso de la lactato-deshidrogenasa que forma lactato como producto final del metabolismo de la glucosa.(5)

1.2 VIA DE LAS PENTOSAS

Hay un 5% de la glucosa del hematíe que se metaboliza por una vía oxidativa directa, la derivación de las pentosas-fosfatos.

Esta vía es la fuente del NADPH, cofactor también del sistema enzimático de la metahemoglobin-reductasa aunque de menor importancia que el NADH.

En esta vía, la glucosa-6-fosfato se oxida en posición 1, produciendo anhídrido carbónico.

El NADP⁺ se reduce a NADPH en este proceso de oxidación de la glucosa.

El fosfato de pentosa que se forma cuando la glucosa se descarboxila sufre una serie de reajustes moleculares que se traducen en la formación de gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato.

Estos son los intermediarios normales en la glucólisis anaeróbica y de este modo unifican el curso metabólico.

Debido a que la reacción de la fosfoglucosa isomerasa es espontáneamente reversible, de tal forma que la fructosa-6-fosfato se puede convertir en glucosa-6-fosfato, resulta posible que se renueve el ciclo a través de la vía del monofosfato de hexosa.

La función primaria de la vía de las pentosas fosfatos es la reducción de NADP⁺ y la cantidad de glucosa que pasa a través de esta vía se regula por la cantidad de NADP⁺ que se proporciona por la oxidación de NADPH.

La función primordial del NADPH parece ser como sustrato para la reducción del glutatión que contiene disulfuros en el eritrocito a través de la intervención de la glutatión-reductasa, que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) y la reducción de disulfuros mixtos de Hb y GSH. (5)

1.3 TRANSPORTE DE OXÍGENO Y 2,3-DPG

La principal función del eritrocito es el transporte de oxígeno.

Este transporte lo realiza la Hb, la cual es una macromolécula casi esférica dentro del hematíe. Está estructurada por cuatro cadenas peptídicas unidas entre sí por enlaces no covalentes, poseyendo cada una de ellas un grupo hemo

con el átomo de hierro.

El interior de cada cadena es de carácter apolar; por esto, el hierro se mantiene en forma ferrosa apto para el transporte de oxígeno (6).

El hierro del grupo hemo, en forma ferrosa, presenta seis valencias de coordinación, cuatro de ellas son coplanarias con el átomo de hierro, siendo a través de éstas la unión a los átomos centrales del anillo tetrapirrólico; las dos posiciones de coordinación residuales no son coplanarias y por una de ellas se une a una de las histidinas interiores, llamada histidina proximal ligada, y por la otra puede hacerlo al oxígeno.

Para que la oxiHb con alta afinidad por el oxígeno se desprenda de éste en los tejidos, es necesario que ocurran cambios conformacionales en la macromolécula o reordenaciones espaciales en la cavidad central de la cadena, alterándose la carga local del entorno de la histidina unida al hierro, que pierde el oxígeno, llamándose entonces a la macromolécula, desoxiHb.

La saturación se define como la fracción de ocupación de los centros de unión del oxígeno.

La afinidad del oxígeno puede ser caracterizada por una cantidad denominada P50 que es aquella presión parcial de oxígeno a la cual se encuentra llenos el 50% de los centros de unión.

El 2,3-DPG, metabolito de la glucólisis, actúa sobre la curva de disociación de la Hb desviándola hacia la derecha indicando una menor afinidad por el oxígeno.

El mecanismo de acción del 2,3-DPG, para disminuir la afinidad por el oxígeno, es la estabilización de la estructura cuaternaria de la desoxiHb por medio de enlaces cruzados en la cadena beta. (7)

Además del 2,3-DPG, el ATP y otros ésteres de fosfato se

fijan al mismo punto sobre la molécula de Hb. El efecto del ATP sobre la afinidad por el oxígeno es de magnitud similar (mol por mol) al 2,3-DPG. Sin embargo, como hay 3 ó 4 veces más 2,3-DPG que ATP en el hematíe, el primero será más importante con respecto a la afinidad por el oxígeno.

1.4 RUTA DE LOS POLYOLAS

La ruta del sorbitol es una vía accesoria en el metabolismo de la glucosa. En esta ruta, compuesta por una cadena de reacciones, el sorbitol es un intermediario que convierte la glucosa en fructosa.

En esta vía actúan dos enzimas: la aldosa reductasa (alditol:NADP oxidoreductasa), que convierte la glucosa en sorbitol, y la sorbitol deshidrogenasa (L-iditol:NAD oxidoreductasa), que transforma el sorbitol en fructosa.



La actividad de esta ruta depende de la concentración de la glucosa y es independiente de la insulina (8,9). El factor que la ruta del sorbitol requiere, NADPH, compete con otras reacciones que también requieren este cofactor, como ocurre en la reducción del glutati6n oxidado a reducido; esta reacción es esencial para la protecci6n de las membranas celulares y otros componentes de las células.

La fuente de NADPH es la vía de las pentosas fosfatos cuyo

flujo es, generalmente, dependiente de la relación NADP/NADPH.

La utilización del NAD y la producción de NADH significa, que la ruta del sorbitol compite con la glucólisis. El aumento de la relación NADH/NAD determina la reacción a favor de la conversión de dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato (10). Se observó que el aumento del flujo, a través de la ruta del sorbitol en lentes de ratas, está emparejada con el aumento de la actividad de la vía de las pentosas fosfatos y disminución de la glucólisis. Este hecho está asociado con el acumulo de glicerol-3-fosfato y reducción en la disponibilidad para reducir el glutati6n (11).

1.4.1 Aldosa Reductasa. (alditol:NADP oxidoreductasa)

Esta enzima, cataliza la conversi6n de glucosa libre a sorbitol (reac.1). Posee amplia afinidad por algunas aldosas, y se caracteriza por la baja afinidad para la glucosa y galactosa. Esta baja afinidad por las hexosas y la excesiva cantidad de hexosas libres en diabetes y galactosemia causan un aumento de la formaci6n del azúcar-alcohol, sorbitol y galactitol respectivamente.

La aldosa reductasa requiere NADPH para esta actividad; la célula se provee del NADPH, primeramente por la vía de las pentosas monofosfato, cuyo flujo es dependiente de la relación NADP/NADPH. La conexi6n entre la vía de las pentosas monofosfatos y la ruta del sorbitol ha sido descrita en lente y nervio periférico (12).

In vitro, la actividad aldosa reductasa está acrecentada en presencia de mercaptoetanol y estimulada por sulfato de litio. El enzima dispone de propiedades alostéricas y existe un estado de equilibrio, entre una forma activa y dos subunidades inactivas.

El coenzima de esta reacci6n, NADP, inhibe al enzima a concentraciones fisiol6gicas por alteraciones del equilibrio, en favor de la subunidad inactiva. La reacci6n catalizada por la

aldosa reductasa es unidireccional; el equilibrio favorece la actividad de la reacción.

Un enzima de la vía ac. glucurónico-xylulosa, el NADP-L-hexonato deshidrogenasa, tiene mucha similitud con la aldosa reductasa, y también se encuentra presente en muchos tejidos. La hexonato deshidrogenasa tiene escasa actividad para convertir hexosas en sus respectivos azúcar-alcoholes, y es más activa en la reducción del ácido urónico. Las dos enzimas se pueden distinguir, bien por diferente movilidad en cromatografía de columnas de DEAE-celulosa, bien inmunológicamente, utilizando un anticuerpo específico para la aldosa reductasa que no interacciona con la hexonato deshidrogenasa (12).

1.4.2 Sorbitol Deshidrogenasa. (L-Iditol:NAD-oxidoreductasa)

La conversión de sorbitol a fructosa está catalizada por la sorbitol deshidrogenasa (reac. 2). Esta enzima dispone de numerosos sustratos específicos para muchos polialcoholes, convirtiéndolos en sus respectivos cetozúcares, como sorbitol y manitol en fructosa, xylitol a D-xylulosa, y ribitol a D-ribulosa, etc. La sorbitol deshidrogenasa ha sido aislada y purificada en numerosos tejidos y ha demostrado ser hormonalmente sensible durante el desarrollo de los órganos sexuales. La reacción catalizada por la sorbitol deshidrogenasa es reversible, y el NADPH puede ser utilizado en la acción inversa tanto como el NADH. La reacción hacia la derecha solo utiliza NAD⁺ (12).

La determinación enzimática del sorbitol por la sorbitol deshidrogenasa es complicada debido a la afinidad por otros muchos sustratos desplegada por esta enzima; por ello es necesaria una rigurosa prueba de la identidad del sorbitol por cromatografía de gas líquido de los derivados trimetilsilil y acetatos.

1.4.3 Distribución en los tejidos

El criterio para establecer la presencia de la ruta del sorbitol en tejidos es la identificación de la aldosa reductasa. Para ello es necesario diferenciar la actividad de esta enzima de la actividad de la hexonato deshidrogenasa (aptdo 1.4.1).

Recientes estudios en ratas y conejos han demostrado, que la enzima inicial de esta secuencia, la aldosa reductasa, está presente en gran cantidad de tejidos.

Esta ruta metabólica menor fue reconocida primeramente en glándulas accesorias del tracto genital enfermo, donde se producía la cadena de reacciones que llevaba la D-glucosa hasta fructosa (reacc. 1 y 2).

Esta secuencia de reacciones son irreversibles en vesículas seminales, lente, aorta y células de Schwann, donde han sido más ampliamente estudiadas.

También, se ha encontrado que el sorbitol y la fructosa libre se encuentran en eritrocitos diabéticos en concentraciones que exceden las plasmáticas. Este sorbitol es resultado de la actividad de la aldosa reductasa y como respuesta a la concentración de glucosa del medio, ya que existe correlación directa entre los niveles de sorbitol del eritrocito y concentraciones de glucosa en plasma. Los niveles de sorbitol del hematíe proporcionan información de la actividad de la ruta de los polyoles in vivo, lo cual puede ser importante en la patogénesis de las complicaciones asociadas a la diabetes. (9)

El interés centrado en la actividad de la ruta del sorbitol en tejidos, es debido a su potencial poder patológico cuando aumenta la actividad de dicha vía metabólica en estados hiperglucémicos (8).

1.4.4 Inhibidores de la aldosa reductasa

Han sido descrito numerosos inhibidores de la aldosa reductasa. El ácido glutarico y sus análogos como el ácido 3,3-tetrametil glutarico (TMG), y el ácido dimetilglutarico (DMG) han sido muy útiles en el estudio del papel de la ruta de los polioles en tejidos in vitro. Aunque análogos del ac. glutarico son muy efectivos en el estudio in vitro, son inefectivos en el estudio in vivo, porque existen limitaciones en la absorción y la penetración. Se encontró que la colchicina es un potente inhibidor de la aldosa reductasa y más recientemente, ha sido descrito un efectivo inhibidor: el ac. 1,3 dioxo-1H benzi[de]isoquinolina-2[3H] acético. Este demostró tener una completa potencia en animales de experimentación y no ejercía efectos de toxicidad a niveles terapéuticos. Estos inhibidores son importantes por la relación con el acumulo de sorbitol y la formación de manifestaciones diabéticas, y pueden tener un posible uso clínico en el futuro (12).

2. PAPEL DE LA ACETIL-COLINESTERASA EN LA DIABETES

La acetilcolinesterasa es una enzima directamente implicada en la neuropatía diabética, que se caracteriza por cambios morfológicos asociados a la disminución de la velocidad de conducción motora y sensitiva en el nervio (13).

La actividad de la acetilcolinesterasa está disminuida en la diabetes insulín-dependiente. El tratamiento con insulina restaura la actividad acetilcolinesterasa a la normalidad (14). La insulina desempeña un papel importante en el mantenimiento de la actividad Na⁺-K⁺-ATP-asa en la membrana del eritrocito.

En ratas diabéticas se ha observado una reducción en el transporte de acetilcolinesterasa por las neuronas colinérgicas (15).

La membrana del eritrocito de diabéticos tipo I no controlados tienen un aumento del flujo de membrana comparado al normal, y el flujo retorna a la normalidad después del tratamiento con insulina. La insulina produce disminución del flujo de la membrana del eritrocito. La disminución de la actividad de esta enzima en eritrocitos de diabéticos está explicada, en parte, por cambios en los fluidos característicos de la membrana, en respuesta a la disminución de los niveles de insulina en la diabetes (13).

La actividad acetilcolinesterasa está influida por fenómenos de superficie de la membrana. En la diabetes se ha encontrado una disminución del ac. siálico de la membrana del eritrocito (16), que constituye el principal componente cargado de la membrana. Esta pérdida en la superficie de la membrana del eritrocito, en la condición diabética, puede reducir el total de cargas negativas en la superficie del eritrocito, y consecuentemente su potencial de membrana.

La actividad acetilcolinesterasa está negativamente correlacionada con los niveles de glucosa en sangre, y esto puede ser debido a un efecto dependiente de la concentración de insulina. Similarmente, el número de moléculas de enzima activa en la superficie del eritrocito está controlado por la insulina; esta deficiencia se manifiesta en la diabetes por una disminución de la V_{max} del enzima (17). La insulina altera el microambiente de la membrana de este enzima por cambios en el flujo de membrana, o ayuda a mantener el número de moléculas activas del enzima, esto no es bien conocido. Algunas de las propiedades de la acetilcolinesterasa presentes en tejido cerebral y eritrocitos son similares, y la insulina desempeña un potencial papel como neurotransmisor o neuromodulador en tejido cerebral (13).

Recientemente ha sido implicado un glucosilfosfatidilinositol en la acción de la insulina. La cabeza polar de este fosfoligosacarido, que contiene glucosamina-inositol-fosfato, galactosa y varios fosfatos adicionales, mimetiza

diversas acciones biológicas de la insulina cuando se añade a células intactas (18).

La insulina promueve la hidrólisis del glucosilfosfatidilinositol situado en la cara externa de la membrana plasmática generandose su cabeza polar. Esta penetra en el interior de la célula mediante un mecanismo aún desconocido y modula el estado de fosforilación de proteínas que son enzimas claves del metabolismo. La cabeza polar podría ampliar la acción de la insulina alcanzando células que no tienen receptor de insulina pero que son capaces de transportar esta molécula a su citosol (18). La síntesis de glucosilfosfatidilinositol se ha encontrado reducida en nervio ciático de diabéticos (19).

La reducción de la velocidad de conducción del nervio motor es secundaria a la pérdida de mio-inositol del nervio diabético; esta deplección de mio-inositol actúa sobre la actividad Na⁺-K⁺-ATP-asa y produce alteraciones en el flujo electrolítico de la membrana celular (se expondrá en el apartado 3). Esto se une a la disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa por alteración del flujo axonal, el cual está causalmente envuelto en el desarrollo de la neuropatía diabética (15).

3. BASES BIOQUÍMICAS DE LAS COMPLICACIONES DIABÉTICAS

La absoluta o relativa deficiencia de insulina que se produce en la diabetes, puede ser aminorada por la dieta, inyección de insulina o agentes hipoglucemiantes orales, pero no previenen el desarrollo de las complicaciones crónicas (19).

Winegrad, en 1987 (20), puso en evidencia la existencia de un común mecanismo que causaba cambios funcionales en nervio periférico, riñón y retina, y conducía a la iniciación de los riesgos clínicos debido a los disturbios producidos en estos

tejidos (14).

La hiperglucemia crónica, a consecuencia del déficit de insulina, conduce a un aumento de la actividad de la ruta de los polyoles; esto causa una deplección del depósito de mio-inositol que conlleva perturbaciones en la regulación de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ -asa con un eventual deterioro de su actividad funcional (21).

El aumento de la actividad de la ruta de los polioles produce una reducción en la velocidad de conducción del nervio motor; esto se debe a que disminuye el contenido de mio-inositol en axones de nervio periférico y células de Schwann (22).

El mio-inositol, uno de los isómeros cíclicos del sorbitol, juega un importante papel en algunas funciones celulares del nervio, como transporte de electrólitos, de aminoácidos, y transmisión del impulso nervioso. Alteraciones en el metabolismo de este precursor de los fosfolípidos del axón son responsables de algunos cambios funcionales en la neuropatía diabética (23). En nervio ciático diabético existe una reducción del contenido de mio-inositol, de la síntesis de fosfatidilinositol, y de las actividades de CDP-diglicerido-inositol transferasa y fosfatidilinositol 4-fosfato quinasa (19).

El tratamiento con inhibidores de la aldosa reductasa y el suplemento en la dieta de un 1% de mio-inositol previene el aumento de sorbitol y fructosa en nervio periférico y la disminución de la velocidad de conducción en el nervio motor, pero no altera la hiperglucemia, ni varía los niveles de glucosa en el nervio (21).

El flujo extracelular de mio-inositol es esencial para mantener los depósitos de mio-inositol en el axón del nervio normal. La deplección de estos depósitos conduce a una inhibición de la normal actividad basal de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ -asa, que es un enzima transportador de la membrana plasmática



celular. Este enzima utiliza la energía de la hidrólisis del ATP, atravesando la intacta membrana plasmática de las células. La actividad $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP-asa}$ es esencial para mantener el alto gradiente de Na^+ y K^+ en las membranas celulares (21). Brismar y Sima, en 1981 (24), demuestran que el decrecimiento de la velocidad de conducción del nervio en estados diabéticos es consecuencia de la reducción de la actividad $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP-asa}$ axonal.

El riñón es otro órgano afectado en la diabetes. Un mecanismo similar es el responsable del aumento de la tasa de filtración glomerular encontrado en jóvenes diabéticos insulín dependientes (25). Este aumento del filtrado glomerular está asociado con hipertrofia glomerular y renal, y precedida por el engrosamiento de la membrana basal del capilar glomerular. Estos cambios renales son corregidos por la normalización de la glucosa en sangre con insulina. Gabbay y O'Sullivan, en 1968 (26), encontraron aumentados los niveles de polioles en papilla renal diabética; esto se previene con inhibidores de la aldosa reductasa (27). Goldfarb et al (28), encontraron que el tratamiento con inhibidores de la aldosa reductasa, de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina, previene el aumento del filtrado glomerular sin afectar la hiperglucemia. Esto sugiere, que el mecanismo que causa el descenso de la velocidad de conducción de nervio motor, es responsable de las alteraciones renales (22).

Las lentes diabéticas con cataratas contienen altos niveles de polioles. El acumulo intracelular de sorbitol causa un edema osmótico y la disrupción de la arquitectura celular. El mio-inositol intracelular está bajo, acompañándose del aumento de la concentración de Na^+ y disminución de la actividad $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP-asa}$. Este proceso de edema y desbalance electrolítico da como resultado una precipitada pérdida de la integridad osmótica con masivo influjo de iones de Na^+ , Cl^- y agua, y la aparición de la opacidad de la lente (12,22).

En la barrera retiniana de diabéticos insulín-dependientes existen cambios en la permeabilidad. Esta alteración está precedida por un engrosamiento de la membrana basal de los capilares de la retina; se piensa que se debe a alteraciones del epitelio pigmentado de la retina. Estos cambios confieren el riesgo de edema y disturbios vasculares de la retina. MacGregor y Matschinsky, en 1986 (29), observan la presencia del aumento de los niveles de glucosa y sorbitol en el epitelio pigmentado de la retina en conejos con diabetes inducida. Esto se acompaña de una disminución del mio-inositol, aumento de la concentración de Na^+ y pérdida de la actividad $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP-asa}$ en el epitelio pigmentado de la retina. Todo ello contribuye al edema retiniano. Estos cambios son corregidos con inhibidores de la aldosa reductasa o con un 1% de mio-inositol en la dieta, indicando que un mecanismo similar a los discutidos anteriormente, en conexión con la velocidad de conducción del nervio motor y cambios renales, también están operando aquí (22).

3.1 EN LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

3.1.1 Alteraciones en la membrana celular

En la diabetes, existe una anómala predisposición a la disminución de la oxigenación de los tejidos que juega un importante papel en el desarrollo de las complicaciones diabéticas. Esto incluye aumento de la agregación eritrocitaria y disminución de la deformabilidad, aumento de los niveles Hb glicosilada, disminución de los niveles de 2,3-DPG, aumento de la agregación plaquetaria, elevación de la viscosidad de la sangre, aceleración del consumo de fibrinógeno, descenso de los niveles de antitrombina III, ascenso del factor de Von Willebrand y disminución de la fibrinólisis (19).

El aumento de la agregación de eritrocitos que se ha observado en diabéticos, puede contribuir a cambios

obliterativos microvasculares en la retina; aunque esto parece más una consecuencia del aumento de los niveles de proteínas en plasma que un cambio de los hematíes en sí. Esta anormal agregación de los hematíes en la diabetes no se ha correlacionado con el grado de elevación de la Hb glicosilada y no se ha podido establecer que juegue algún papel en la patogénesis de las secuelas microvasculares (19).

La deformabilidad del eritrocito es significativamente baja en la diabetes, pudiéndose dañar la rápida y homogénea perfusión en la microcirculación. La base para la reducida deformabilidad es desconocida, pero la relación con el grado de control de la diabetes sugiere una etiología metabólica. La elevación de la microviscosidad de la membrana del eritrocito observada en diabéticos puede ser consecuencia del aumento de la glicosilación de las proteínas de la membrana. La disminución del contenido de ac. siálico y colesterol observados en eritrocitos de ratas y humanos diabéticos (16), sugieren que la membrana puede tener adversamente afectada la deformabilidad característica de estas células.

Estudios realizados en leucocitos circulantes de diabéticos han demostrado numerosas anomalías funcionales en PMN y en linfocitos. Los PMN de diabéticos mal controlados exhiben defectos en la adherencia granulocítica, quimiotaxis, fagocitosis y actividad bactericida intracelular. Linfocitos de diabéticos juveniles mal controlados presentan disminución de la respuesta proliferativa a la estimulación mitógena y reducción de los marcadores de superficie de membrana de las células B y T. Todas estas alteraciones vuelven a la normalidad con un óptimo control de la glucemia (19).

Todo esto sugiere que cambios en la movilidad y distribución de los componentes de la membrana plasmática, tanto como cambios en la composición química de la membrana de superficie, pueden alterar significativamente la función celular. En la diabetes se producen alteraciones en distintas propiedades celulares que pueden desempeñar un papel en el

desarrollo de las complicaciones, y esto es, en parte, resultado de cambios en la superficie celular (19).

Estudios en la membrana plasmática de células del hígado, en ratas diabéticas, han demostrado significativos cambios en los receptores de membrana. La unión de la tiroxina desializada ligada a globulinas, en interacción dependiente de los residuos de ac. siálico de la membrana, está reducida al 50%. Estos cambios sugieren una disminución selectiva del contenido de ac. siálico de estos específicos receptores (22), o cambios en la estructura o movilidad de los receptores componentes de la superficie de la membrana.

La bases químicas de los cambios que se producen en la membrana celular no están claros. Sin embargo, el déficit de insulina y los secundarios cambios en metabolitos y hormonas pueden afectar la síntesis macromolecular en ciertos tejidos.

3.1.2 Alteraciones metabólicas en el eritrocito: Papel de la ruta de los polioles en las complicaciones de la diabetes

En estados hiperglucémicos se produce un aumento de la actividad de la ruta de los polioles (12).

En estudios realizados in vivo e in vitro, se ha encontrado que el aumento de la concentración de la glucosa en el medio produce elevación de los niveles de sorbitol y fructosa en el eritrocito (8,9). El sorbitol del eritrocito es un indicador de los niveles de sorbitol en los tejidos que participan en la patogenia de las complicaciones de la diabetes (9).

Las enzimas responsables de la reducción de la glucosa a sorbitol y posteriormente a fructosa, es decir, la aldosa reductasa y la sorbitol deshidrogenasa respectivamente, catalizan la reducción (NADPH-dependiente) de la glucosa cuando se encuentran en concentraciones significativamente altas (descrito anteriormente en apartado 1.3).

El aumento de la concentración de la glucosa no significa su total consumo en la producción de lactato, el cual no se encuentra modificado. Sin embargo, el piruvato reconvertido va descendiendo con el aumento de la concentración de la glucosa, produciendo un aumento en el cociente lactato:piruvato. Esta elevación del cociente lactato:piruvato refleja una disminución de la relación $NAD^+/NADH$; el descenso de este cociente en eritrocitos incubados en medios con alta concentración de glucosa, es debido al aumento de la oxidación de sorbitol a fructosa por la NAD^+ ligada a la sorbitol deshidrogenasa. Esta especulación está apoyada por la observación de que el barbital, que inhibe la síntesis de sorbitol por la aldosa reductasa, reduce la relación lactato:piruvato. Bajo estas circunstancias habría una importante reducción de los niveles del total de las pentosas fosfatos (8).

4. MICROALBUMINURIA

En recientes estudios epidemiológicos se ha encontrado que cerca del 30-40% de diabéticos insulín dependientes desarrollan proteinuria y progresivo fallo renal en el curso de 15-20 años después del comienzo de la diabetes.

La aparición de proteinuria ha sido considerada como marcador y punto de partida de la clínica de la nefropatía diabética.

En la fase precoz de la nefropatía diabética, detectable por la microalbuminuria, los niveles de excreción de albúmina se encuentran elevados en un rango entre 30-300 mg/24 h. (20-200 μ g/min) (30, 31).

En 1963, Keen y Chlouverakis (32), desarrollan un específico y sensitivo método de inmunoensayo para detectar la albúmina humana en orina a bajas concentraciones, sobre la premisa de que el aumento subclínico de la excreción urinaria de albúmina puede ser el primer punto para el desarrollo de alteraciones renales diabéticas.

Mogensen (1971) y Parving et al. (33,34), demostraron que había un significativo aumento de la excreción urinaria de albúmina en diabéticos de reciente diagnóstico, tanto insulin-dependientes como no insulin-dependientes.

-Origen, mecanismos y determinantes de la microproteinuria

De la pequeña cantidad de albúmina e IgG normalmente filtradas por los glomerulos, el 95-97% es reabsorbida no selectivamente por el tubulo proximal. El proceso de reabsorción está trabajando a una capacidad cercana a la máxima, por lo que moderados aumentos en las proteínas filtradas se reflejan en una elevación de la excreción urinaria. La excreción urinaria de albúmina e IgG cambia proporcionalmente a la cantidad filtrada. Cuando la capacidad de reabsorción tubular está saturada, la excreción urinaria de proteínas corre paralela a la filtración (35). La microalbuminuria y la micro-IgG-uria de la diabetes tienen un origen glomerular y están asociadas a una normal función tubular; esto está apoyado por el hallazgo de una normal excreción de beta-2-microglobulinas, como sensible indicador de la capacidad de reabsorción tubular. La excreción urinaria de lisozimas, otras proteínas de bajo peso molecular usadas como medida de función tubular, no está significativamente aumentada en diabéticos.

La corrección de la hiperglucemia por un intensivo tratamiento con insulina en humanos, revierte, en parte, la microalbuminuria en reposo y la inducida por el ejercicio. El estricto control de la glucemia con insulina al tiempo que se induce la diabetes, en ratas, previene el aumento de la excreción urinaria de albúmina (35).

La asociación entre el flujo urinario y la excreción de proteínas totales o albúmina, sugiere que la diuresis inducida por la glucosa puede dañar la reabsorción tubular de albúmina. Sin embargo, en ratas, la diuresis osmótica no afecta la excreción de albúmina; mientras que está aumentada después de una expansión de volumen por un cambio en los niveles de

filtración glomerular. En el hombre diabético, no existe correlación entre la glucosuria y la excreción urinaria de albúmina. La transitoria microalbuminuria vista en sujetos normales después de una sobrecarga de agua, es producida, como en la expansión de volumen de la rata, por transitorios cambios en la filtración glomerular.

El capilar sanguíneo glomerular/barrera urinaria puede ser funcionalmente considerado como una membrana perforada por poros de un tamaño medio de 55 Å y uniformemente cubierta por cargas eléctricas negativas. El tamaño y la carga de las moléculas circulantes, así como el gradiente de presión transglomerular, determinarán el paso de proteínas a través de la barrera. En la microalbuminuria del diabético, el aclaramiento de albúmina, un polianión, y de la Ig G, una grande y esencial molécula neutra, se encuentran aumentados. Esto es a consecuencia de un aumento de su filtración glomerular. La relativa filtración de estas dos moléculas cambia al aumentar los niveles de microalbuminuria. Cuando la excreción de albúmina aumenta la excreción de Ig G está proporcionalmente aumentada. La inalterada selectividad del aclaramiento de IgG/aclaramiento de albúmina indica que las restrictivas propiedades de la membrana (tamaño del poro/nº y carga) están intactas. El aumento del aclaramiento, tanto de la albúmina como de la Ig G, es debido a un común efecto de aumento del gradiente de presión transglomerular.

Conforme la microalbuminuria aumenta, el índice aclaramiento Ig G/aclaramiento albúmina comienza a descender; debido a un desproporcionado aumento en la filtración de albúmina respecto de la de Ig G y esto marca un nuevo estado de pérdida de selectividad glomerular de albúmina polianiónica. La probable razón del aumento de la filtración glomerular de albúmina es la pérdida de las cargas negativas fijadas a la membrana. Esto permite aumentar la permeabilidad de la albúmina aniónica, influyendo escasamente en la Ig G cuya filtración está regulada por el radio del poro/nº y presión

intraglomerular. El mecanismo de esta transición de bajos a altos niveles de microalbuminuria es desconocido, pero puede ser una combinación del efecto nocivo de la elevación, durante largo tiempo, del flujo y la presión glomerular con la acumulativa anomalía metabólica de síntesis de la membrana electronegativa de glicosialoproteínas y proteoglicanos.

- Macroproteinuria

la transición de micro a macroproteinuria ocurre por un progresivo y aumento en la excreción de albúmina. Los factores determinantes de la transición son desconocidos; ya que variaciones en el grado del control metabólico pueden explicar algunas, pero no todas, las variaciones de riesgo de nefropatía diabética.

Persistente macroproteinuria es casi siempre precedida por un período de proteinuria intermitente. Y una vez establecida la macroproteinuria, se inaugura una fase que conduce, por progresivo deterioro de la función renal, a un estado final de fallo renal. La excreción urinaria de proteínas aumenta con el fallo del filtrado glomerular y existe una significativa correlación negativa entre el filtrado glomerular y el aclaramiento de albúmina e IgG. La excreción de albúmina en 24h. está correlacionada positivamente con la excreción total de proteínas en orina; en el estado de macroproteinuria, la albúmina representa el 50% del total de proteínas en orina. Esto es una alta proporción respecto a sujetos con normoproteinuria (11%) o microproteinuria (22%), apoyando que la restricción selectiva de la filtración de albúmina está perdida en este último estado. El aclaramiento fraccionado de albúmina e IgG aumenta progresivamente con el tiempo y en paralelo con el declive del filtrado glomerular.

El progresivo deterioro de la función renal culmina en un estado final de fallo renal, apareciendo el proceso independiente del disturbio metabólico (35).

5. GLICOSILACION DE PROTEÍNAS

5.1 HEMOGLOBINA GLICOSILADA

La hemoglobina glicosilada es un componente menor del eritrocito que comprende el 5% del total de Hb en individuos normales pero está por encima del 15% en pacientes diabéticos (36).

La glicosilación de las proteínas es un regulado proceso post-translacional por el que el cuerpo produce modificaciones en las proteínas con propiedades funcionales específicas. En la glicosilación no enzimática, la glucosa reacciona químicamente con las proteínas en ausencia de un enzima. El grupo aldehído de la glucosa primero forma una aldimina (base Schiff) con residuos de lisina y valina que subsecuentemente reacciona para formar una cetoamina más estable por reacción Amadori. Este primer producto de la glicosilación tipo Amadori, parecidos a las bases Schiff de las que se han formado, son productos en equilibrio químicamente reversibles (22). La Hb A_{1c} es sintetizada lentamente de forma casi irreversible a lo largo de la vida del eritrocito maduro. Sin embargo los eritrocitos no son capaces de sintetizar proteínas, esta continua formación de Hb A_{1c} resulta de la glicosilación post-síntesis de la Hb A existente.

El estado estable de los niveles de Hb A_{1c} se logra a través del reemplazo de los eritrocitos viejos cargados de Hb A_{1c} por los eritrocitos jóvenes con relativa poca Hb. La concentración actual de Hb A_{1c} es una función de la vida media del eritrocito y la velocidad de síntesis de la Hb A_{1c}, que está determinada por la concentración de glucosa en sangre. Sin embargo, los niveles en sangre periférica de Hb A_{1c} no exponen una modificación inmediata, porque los eritrocitos permanecen en la circulación 120 días, después de los cuales expiran. Una simple medida de la Hb A_{1c} refleja la concentración de glucosa en sangre por encima de los dos ó tres meses previos (36).

La síntesis de Hb también puede representar un modelo de reacción para explicar las bases bioquímicas de muchas secuelas de la diabetes de larga evolución. Los tejidos que sufren las disfunciones más notables en la diabetes (retina, lentes, nervio periférico, riñón) son insulín independientes para la entrada de glucosa. En la diabetes, las proteínas intracelulares de estos tejidos padecen una glicosilación no enzimática análoga a la de los eritrocitos. La glicosilación puede alterar la actividad enzimática, solubilidad, antigenicidad u otras funciones de las proteínas y resultar en la observada disfunción clínica. En la diabetes, la afinidad de la Hb por el oxígeno está afectada por la glicosilación no enzimática, ya que interfiere la unión de los órgano-fosfatos tal como el 2-3DPG. Una relativa deficiencia de 2,3-DPG coexiste con un aumento de los niveles de Hb A1c con resultante disminución de la liberación de oxígeno en los tejidos (22); esto no es clínicamente significativo ya que variaciones de la Hb con gran afinidad por el oxígeno no están asociadas a disturbios clínicos (19,36).

La concentración de los productos Amadori en la glicosilación inicial aumenta con el aumento de la concentración de la glucosa en sangre, retornando a la normalidad cuando se corrigen los niveles de glucosa por tratamiento adecuado. Algunos de estos productos Amadori en el colágeno y otras proteínas de larga vida, a través de reacciones, forman los productos finales de la glicosilación. La concentración de estos productos finales no está afectada por la corrección de la hiperglucemia. Una vez formados, están unidos irreversiblemente a las proteínas y continúan acumulándose por encima de la vida media de las proteínas de larga duración, como una función del tiempo y de la concentración de glucosa (37).

El acumulo de productos finales de la glicosilación en proteínas está aumentado en pacientes diabéticos insulín dependientes. Los productos finales interfieren en la matriz proteica conduciendo a modificaciones estructurales y funcionales con consecuentes disturbios clínicos (37).



Las cataratas de lentes diabéticas humanas contienen un alto número de enlaces disulfuros en comparación con lentes normales; esto refleja un aumento de la oxidación sulfidril de las proteínas. La hiperglucemia facilita la agregación de las cadenas cruzadas de proteínas, produciéndose un aumento de los residuos de lisina de la glicosilación no enzimática con la formación de agregados de alto peso molecular y la dispersión de la luz (19). La disminución del glutatión reducido, resultado del aumento de la actividad de la ruta de los polioles (12), puede actuar en conjunción con la glicosilación no enzimática a causa de la mayor formación de enlaces disulfuros (37) .

La glicosilación no enzimática de las proteínas en glomerulo renal de diabéticos puede estar involucrada en el desarrollo de la nefropatía diabética. El disturbio renal está relacionado con la extensión del engrosamiento de la membrana basal glomerular. El aumento del engrosamiento se desarrolla después de años de severa alteración metabólica (22). El continuo depósito de proteínas del suero (albúmina e IgG) o sus productos de degradación en el glomerulo, como resultado del aumento de la permeabilidad con el excesivo acumulo de fibrina por disminución de la fibrinólisis, contribuye a la oclusión capilar glomerular y a la progresión del fallo renal (19). La defectuosa degradación de la fibrina resulta de la excesiva glicosilación no enzimática y conduce al acumulo de fibrina en muchos tejidos diabéticos jugando un significativo papel en el desarrollo de las complicaciones diabéticas (22).

5.2 FRUCTOSAMINA

En 1982 Johnson et al. (38), describieron un método colorimétrico, el test del nitroblue tetrazolium "fructosamina", como evaluación del grado de glicosilación no enzimática de las proteínas del suero y demostrando ser un útil índice del control intermedio de la glucosa (1-3 semanas) (39, 40) .

La fructosamina es sensible a las variaciones en la composición de las proteínas (41); la reacción de la fructosamina es también completamente inafectada por la fracción lábil; la concentración de fructosamina se correlaciona bien con el grado de glicosilación del total de proteínas del suero, específicamente con la albúmina glicosilada y con las inmunoglobulinas glicosiladas. La correlación con la Hb A_{1c}, medida como fracción estable, es muy pobre en diabéticos tratados con insulina o con agentes hipoglucemiantes orales. La fructosamina y la Hb A_{1c} son expresiones de diferentes períodos del control metabólico y por esto tienen diferente significado clínico (41).

Las moléculas de glucosa se unen a las moléculas de proteínas para formar las cetoaminas estables, o fructosaminas, a través de glicosilación, un mecanismo no enzimático incluyendo una lábil base Schiff intermedia y la reacción Amadori. La cantidad de fructosamina en suero está aumentada en la diabetes mellitus debido a la alta concentración de glucosa en sangre. La concentración de fructosamina en suero refleja el grado de control de la glucemia llevado por el paciente diabético y es útil en la monitorización de la efectividad de la terapia en la diabetes durante un período de varias semanas, de manera parecida a la determinación de la Hb A_{1c}. Los valores de fructosamina pueden distinguir al individuo normal y al paciente diabético con buen control, de los diabéticos mal controlados; parecido a la Hb A_{1c}, la cual refleja el aumento de la concentración de glucosa en sangre por encima de seis a ocho semanas, la fructosamina refleja este aumento por un período de dos a tres semanas. La ventaja clínica es que la fructosamina responde más rápidamente a los cambios en la terapia, en consecuencia permite un mejor control de la glucemia. Usado en conjunción con la determinación de glucosa en sangre y de Hb A_{1c}, o por ella misma, la fructosamina proporciona una información clínica útil para la detección y control de la diabetes (42).

6. TRANSFERRINA EN LA DIABETES

La transferrina es una beta globulina del suero que tiene como funciones el transporte de hierro, activación del desarrollo celular y acción bacteriostática. La entrada del hierro en la célula se inicia por la unión de la transferrina a los receptores de la transferrina en la superficie celular.

La transferrina humana contiene dos glicanos en posiciones 413 y 611. La parte terminal de los glicanos puede estar ramificada, dando estructuras bi-, tri- o tetra antenarias que están terminadas normalmente por un residuo de ac. siálico. Cuando uno o más de los residuos de ac. sialicos falta en la transferrina muestran diferentes fracciones electroforéticas. La mayoría de la transferrina que compone el suero humano contiene cuatro moles de ac. siálico por mol de transferrina (tetrasialotransferrina); las transferrinas con otro contenido diferente de ac. sialico en suero son mucho menos abundante (43). Los oligosacaridos con ramificaciones bi-, tri- o tetraantenarias están implicados en el transporte de moléculas de glicoproteínas a las células dianas en la fase inicial de catabolismo. Hay un sistema de reconocimiento de carbohidratos en la superficie celular; por desialización, las glicoproteínas son reconocidas por receptores de membranas específicos en la superficie celular. La desialización se produce en la zona del daño tisular por la acción de la sialidasa intracelular liberada por los lisosomas de las células rotas. Las proteínas desializadas son transportadas hasta sus órganos diana. En severos disturbios, la sialo transferrina padece cambios en la síntesis intracelular de las cadenas de carbohidratos como ocurre en la inflamación, injurias de los tejidos, artritis reumatoide, cáncer, enfermedades hepáticas, embarazo y, tal vez, en la diabetes (44).

La transferrina puede presentar variaciones de sus concentraciones en el suero; sus niveles están descendidos como resultado de una disminución de la biosíntesis (deficiencias

hepáticas, malnutrición), o un aumento del catabolismo, o un aumento de pérdidas intestinales o renales, o muy infrecuentemente desordenes genéticos. El aumento de la transferrina es resultado de otras hiposiderosis o una impregnación estrogénica. El alcoholismo y la diabetes son responsables de variaciones cualitativas de esta proteína (45).

La transferrina ha sido involucrada en las complicaciones diabéticas; así, los radicales libres tratan los daños oxidativos que han sido implicados en la microangiopatía diabética. La transferrina y la ceruloplasmina actúan como antioxidantes en el suero oxidando y quelando el hierro ferroso que actúa como catalizador en reacciones de radicales libres. Midiendo la actividad antioxidante del suero, se encontró que en diabéticos aumenta la concentración de transferrina y la capacidad de unión del hierro; la ceruloplasmina, medida por esta actividad ferroxidasa, también aumenta. El aumento de las concentraciones del hierro oxidado y el hierro unido a proteínas ocurre en el suero de diabéticos y el aumento de la actividad antioxidante del suero puede ser una respuesta al stress oxidativo (46).

La transferrina también ha sido relacionada con la glicosilación de las proteínas del suero y su posible papel en el diagnostico precoz de la nefropatía diabética.

Estudios in vivo e in vitro han conducido a la evaluación de la aplicación clínica de la glicosilación de la hemoglobina y de las proteínas del plasma en el diagnostico y seguimiento de la diabetes. Las proteínas del suero fueron glicosiladas in vitro y la glicosilación fue lineal a la concentración de glucosa y al tiempo de incubación. La albúmina y la transferrina son las principales proteínas significativamente glicosiladas (47). La albúmina y la transferrina glicosiladas se encuentran elevadas en suero de diabéticos; son marcadores del control de la glucosa a corto plazo; la transferrina tiene una vida media de 8 días, mientras que la albúmina tiene un período de 10 días (48).

La excreción urinaria de transferrina se encuentra elevada

en la diabetes y está asociada al aumento de la excreción urinaria de albúmina y otras proteínas; su importancia radica en su papel en el diagnóstico precoz de la nefropatía diabética (49).

7. CARÁCTER INMUNOLÓGICO DE LA DIABETES.

La diabetes tipo I (insulin-dependiente) es una enfermedad auto-inmune determinada genéticamente y su sintomatología representa el punto final de un lento proceso de destrucción inmunológica de las células beta productoras de insulina (50).

La naturaleza genética de la diabetes tipo I viene determinada por el hecho de la asociación de la aparición de la enfermedad con tipos específicos de histocompatibilidad (HLA).

Los genes de histocompatibilidad se dividen en tres clases: genes de clase I, que codifican los antígenos de trasplantes; genes de clase II, que codifican las proteínas que intervienen en la interacción monocito-linfocito, y genes de clase III, que codifican el complemento. Existe evidencia de que uno de los principales loci para la diabetes se sitúa en un gen de clase II. Estos genes codifican una serie de polipéptidos diméricos que se expresan sobre la superficie de los linfocitos B, sobre un subgrupo de macrófagos, sobre células natural Killer, sobre linfocitos T activados, sobre células endoteliales y sobre células foliculares tiroideas en pacientes con enfermedad de Graves.

Aunque el mecanismo sigue sin estar aclarado, la existencia de un defecto en los genes de clase II asociado con un trastorno en la función de los linfocitos T parece desempeñar un papel crítico en la patogenia de la diabetes (50).

Los antígenos HLA son glucoproteínas de membrana. Estos antígenos se hallan codificados por una familia de genes situados en el brazo corto del cromosoma 6 que contienen los genes de varias fracciones del complemento y de las linfocinas

Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y linfotoxinas (LT) (51).

El establecimiento de la diabetes tipo I aparece precedido por una elevación de las células T circulantes portadoras de antígeno Ia, que es el producto de los genes de clase II del complejo HLA, que se expresa en las fases tardías de la activación de los linfocitos. Este incremento se ha observado también en personas con otras enfermedades autoinmunes asociadas al sistema HLA, así como también en otros estados de activación inmunológica, como la mononucleosis infecciosa.

En diabéticos tipo I y sus familiares se han estudiado tres autoanticuerpos, que se han encontrado con mayor frecuencia que en la población normal. Uno de ellos es el autoanticuerpo contra el citoplasma de las células de los islotes (ICA). Este anticuerpo reacciona con el citoplasma de todas las células de los islotes, reconociendo probablemente a un complejo lipídico llamado gangliósido (50,52). La falta de especificidad de este anticuerpo para las células beta (únicas destruidas en pacientes diabéticos) y la no accesibilidad de sus autoantígenos hacen improbable que tengan un papel patogénico directo. La importancia patogénica de los ICA es objeto de controversia, pero lo que es innegable es su valor como marcador de individuos con alto riesgo de desarrollar diabetes (51).

Un segundo autoanticuerpo es el denominado 64-K (ICSA), ya que reacciona con una proteína del islote de la que se sabe poco, excepto que su peso es de 64 Kilodalton (K). Dicha proteína se encuentra solo en la membrana plasmática de las células beta (51,52).

El tercer autoanticuerpo se une específicamente a la insulina. Casi todos los pacientes tratados con insulina producen anticuerpos estándar que reconocen la hormona inyectada; sin embargo, se pueden identificar estos anticuerpos en muchos diabéticos insulín-dependientes, antes de la primera inyección de la hormona. Si alguno de estos autoanticuerpos dirige su ataque contra las células beta se tratará, probablemente, de la variedad 64-K. Son anticuerpos específicos

para dicha célula; aparecen antes que los otros dos tipos de anticuerpos y mucho antes de que la enfermedad pueda diagnosticarse. El tipo 64-K es el único encontrado en los dos modelos de roedores diabéticos insulín-dependientes: la rata BB y el ratón NOD (diabético no obeso). En estas especies, el autoanticuerpo 64-K se produce a una edad temprana, coincidiendo con el comienzo de la insulinitis.

Existen escasas pruebas de que los autoanticuerpos constituyan el principal causante de la destrucción de las células beta. La inmunidad mediada por células, más que por anticuerpos, parece la principal responsable del desarrollo de la diabetes insulín-dependiente. El linfocito coadyuvante ("helper") es el principal protagonista, y posee receptores que reconocen a antígenos específicos. Los linfocitos T se activan cuando el receptor se une al antígeno, que está unido a una molécula del CMH II (complejo mayor de histocompatibilidad) en los macrófagos y en otras células presentadoras de antígenos.

Una vez activadas, las células T coadyuvantes segregan citocinas que incrementan la respuesta inmune. Una de estas citocinas, la interleucina-2, estimula la proliferación de los propios linfocitos T coadyuvantes, así como la de los citotóxicos, o células T asesinas. Los linfocitos T citotóxicos reconocen al antígeno únicamente cuando se halle unido a una molécula del CMH I. Otras interleucinas estimulan la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, incrementando la respuesta humoral.

Se piensa que los linfocitos T son los principales causantes de la muerte de las células beta pancreática.

Esta autoinmunidad en la diabetes podría provocarse por un proceso de mimetismo molecular (52). En tal proceso, un antígeno extraño podría instar una respuesta inmune normal en cualquier lugar del organismo. Si la conformación o la composición química de este antígeno corriese gemela a la de algún componente de la célula beta, el antígeno podría estimular un ataque contra la célula beta. El mimetismo molecular se halla claramente implicado en otras enfermedades autoinmunes, como es

la fiebre reumática, que se puede producir después de una infección estreptocócica de garganta.

Es probable que la proteína 64-K sea una réplica de algún antígeno extraño, y provoque el ataque autoinmune en las células beta. Mueve a pensar así, la aparición temprana de anticuerpos contra esta proteína, que sugiere que la proteína 64-K adquiere importancia en los primeros estadios del ataque contra las células beta.

Se sospecha que la desproporcionada agresión autoinmune contra las células beta posee más de una causa. Parece provenir, en parte, de una hiperreacción de los linfocitos T coadyuvantes ante los autoantígenos de las células beta. Por otro lado, los mecanismos supresores del sistema fallan en su cometido o lo desempeñan de forma apagada. Se conoce poco sobre el proceso normal de supresión de la actividad autoinmune; se ignora por qué dichos procesos no interrumpen la destrucción autoinmune de las células beta. Pero, estudios realizados con ratones NOD sugieren que el fallo podría tener base genética.

En estos animales, las anomalías genéticas en la región del CMH de clase II contribuyen a que sus portadores sean propensos a desarrollar diabetes. Los genes de dicha región que codifican la proteína IA (es primordial para el reconocimiento antigénicos por los linfocitos T) aumentan la proclividad a la diabetes.

La región CMH II se ha asociado también con la sensibilidad a la diabetes insulín-dependiente en humanos. Esta región D, así se le conoce, comprende tres loci -DP, DQ y DR-, cada una de las cuales codifica una sola molécula formada por dos cadenas aminoacídicas: A y B. Hasta ahora solo se han relacionado con la diabetes los loci DQ y DR. Los genes que determinan las proteínas DR1, DR3 y DR4 abundan en los diabéticos insulín-dependientes, mientras que escasean los que determinan DR2 y DR5. La herencia del gen DR4 suele ir ligada al gen que codifica la proteína DQw3.2. Los individuos que heredan el código genético de la proteína DQw3.2 son bastante propenso a

desarrollar la enfermedad.

No se sabe cuantos genes están implicados en la diabetes humana, ni tampoco su mecanismo de transmisión. Es de esperar que se descubran asociaciones entre diabetes humana y genes que se hallen fuera del complejo mayor de histocompatibilidad. Lo mismo que ocurre en los ratones NOD, muchos genes contribuyen a la sensibilidad a la diabetes (50,52).

II OBJETIVOS

La diabetes mellitus, expresión clínica de la absoluta o relativa deficiencia de insulina, afecta a 20-30 millones de personas en el mundo. Sin embargo, la deficiencia de insulina puede ser aminorada por la dieta, inyección de insulina o agentes hipoglucemiantes orales como tratamiento estandar, pero no previene el desarrollo de las complicaciones crónicas que afectan ojos, riñones, nervio y arterias.

En base a esto, el objetivo de este trabajo fue estudiar distintos parámetros bioquímicos que detectaran, de forma precoz, las complicaciones que a largo plazo produce la diabetes; y con ello poder prevenirlas y tratarlas en fases reversibles, antes de que se establezcan las alteraciones orgánicas permanentes.

Los parámetros bioquímicos analizados fueron los siguientes:

a) Los niveles de fructosamina en suero de diabéticos no insulín-dependientes (tipo II), de reciente diagnóstico, relacionándola con otros parámetros de estos diabéticos para comprobar la relación entre la hiperglucemia mantenida y las posibles anomalías de estos parámetros.

b) La concentración de microalbuminuria en orina, en relación a la fructosamina, por su importancia en la detección precoz de la nefropatía diabética y la influencia que los estados hiperglucémicos tienen en la aparición de esta complicación.

c) Las variaciones producidas en la concentración de transferrina, por efecto de la hiperglucemia, en suero de diabéticos no insulín-dependientes. Así mismo, analizamos las posibles interacciones que pudiera sufrir este parámetro cuando se asocia con otras patologías.

d) El efecto producido por la diabetes en la actividad aldosa reductasa en hematíes humanos. También examinamos, el efecto que produce el estado diabético y pre-diabético, a nivel

experimental, sobre este enzima en hematíes y diferentes tejidos de animales.

e) De igual forma, examinamos las modificaciones producidas en la actividad acetil-colinesterasa en hematíes, de forma experimental (en las fases diabética y pre-diabética) y en la diabetes clínica, por la implicación, que se le ha atribuido, en el desarrollo de la neuropatía diabética.

También se analizó el efecto producido por el ácido β hidroxibutírico sobre la actividad de este enzima en hematíes sanos. Debido a que este metabolito es uno de los cuerpos cetónicos que se encuentra elevado en la cetoacidosis que se presenta en la diabetes descompensada.

III MATERIAL Y MÉTODOS



1. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados han sido comercializados por Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A., Böeringer Mannheim, Merck, Roche Diagnostic, Ames.

2. ANIMALES

Se sacrificaron ratas machos Wistar albino procedentes del animalario de nuestra facultad, después de un mes y medio de su nacimiento. Se mantuvieron a temperatura ambiente y su alimentación consistió en una dieta estándar y agua "ad libitum". El peso de los animales era aproximadamente de 150 gr.

Se consideró un grupo de animales controles y en otro grupo se indujo una diabetes experimental mediante la administración intraperitoneal de 100 mg por Kg de peso de estreptozotocina, 72 horas antes del sacrificio de los animales. Este compuesto se había disuelto previamente en NaCl 0,9% (p/v) y citrato sódico 50 mM pH 4. En todos los animales se verificó la glucosuria por medio de tiras indicadoras Keto Diastix (Bayer).

También se han empleado ratones de la misma procedencia que las ratas. Estos animales tenían un peso aproximado de 30 gr. Se utilizaron controles, diabéticos y pre-diabéticos. La pre-diabetes fue inducida mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina durante 5 días consecutivos a dosis submáxima de 25 mg/Kg de peso. Los ratones fueron sacrificados 5 días después de la administración de la última dosis de estreptozotocina. La diabetes fue inducida por el mismo procedimiento que en las ratas.

En todos los animales se determinó la actividad aldosa reductasa y acetil-colinesterasa.

3. HUMANOS

Se ha estudiado un grupo de pacientes con diabetes no insulín-dependiente, de reciente diagnóstico, con edades comprendidas entre los 22 y 70 años.

Como grupo control se utilizó a personas sanas voluntarias (donantes de sangre) y cuyas edades oscilaban entre 18 y 55 años.

En ambas poblaciones se ha determinado acetilcolinesterasa, aldosa reductasa, glucemia, fructosamina, Hb A1c y microalbuminuria.

También se ha estudiado un grupo de 135 pacientes, de los que 74 no eran diabéticos y 61 eran diabéticos con edades entre 20 y 65 años. En esta población se ha medido la transferrina.

En una población de 12 diabéticos insulín-dependientes con una evolución de la diabetes entre 6-20 años y edades comprendidas entre 17 y 45 años, se determinaron los Ac. antiinsulina.

4. MUESTRAS ANALIZADAS

4.1 Hemolizado de hematíes

Todas las muestras de sangre fueron extraídas por venopunción en tubos con EDTA.

Se separaron los hematíes del plasma mediante centrifugado a 3000 r.p.m durante 5 min. Posteriormente, se lavaron los hematíes dos veces con NaCl al 0,9% y tras cada lavado se volvió a centrifugar a la misma velocidad. Los hematíes obtenidos se resuspendieron en buffer fosfato 3 mM, a pH 7,5 y se congelaron a -18°C .

4.2 Suero

Las muestras de sangre se extrajeron mediante venopunción, en tubos de vidrio de 10 ml.

Se separó el suero mediante centrifugación a 3000 r.p.m durante 5 min., se extrajo el sobrenadante mediante pipetas Pasteur y fue almacenado a -18°C

4.3 Homogenado de tejido

Los tejidos empleados fueron timo, hígado, bazo y corazón de ratones.

El homogenado se realizó en una solución tampón compuesta por Tris 50 mM, Cl_2Ca 5 mM, ClK 100 mM y Cl_2Mg 5mM, a pH 7,4.

Se utilizó una relación 1:5 (gramos de tejido:ml de sol. tampón), para la homogenización. El extracto se centrifugó a 15000 g durante 15 min. y se recogió el sobrenadante, en donde se midió la actividad del enzima.

4.4 Orina

Fueron recogidas muestras de la primera orina de la mañana de pacientes diabéticos tipo II.

La orina fue centrifugada a 1500 r.p.m durante 15 min.

5. EXPERIMENTOS IN VITRO

Se realizaron incubaciones en hematíes de personas sanas, resuspendidos en KRB 1:10 (v:v), a 25 y 37°C durante tiempos variables, con adiciones de ácido β hidroxibutírico a distintas concentraciones, en un volumen final de 1 ml, en tubos de plástico; con el objeto de comprobar si esta sustancia modificaba la actividad acetilcolinesterasa en hematíes de personas sanas.

6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

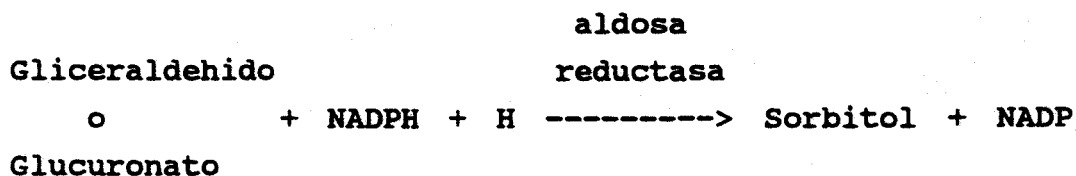
6.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry modificado (53), realizando en cada ocasión una curva patrón empleando albúmina sérica.

6.2 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

6.2.1 Aldosa Reductasa

La actividad se determinó siguiendo el método descrito por Gabbay y Kinoshita (54). Se seguía espectrofotométricamente la oxidación del NADPH según la siguiente reacción:



Reactivos

- 1) Tampón Fosfato Na-K 100 mM, pH 6,2
- 2) NADPH 5 mM en tampón Tris-ClH 10 mM, pH 7,5
- 3) Mercaptoetanol 5mM
- 4) Gliceraldehido 20mM

Muestra analizada

a) Hemolizado de hematíes 1:20 (v/v) en tampón fosfato 3 mM a pH 7,5. Congelado a -18°C y posteriormente descongelado a 25°C y centrifugado a 3000 r.p.m. La actividad enzimática fue medida en el sobrenadante.

b) Homogenado de tejidos de ratones: Se utilizaron

hígado, corazón, timo y bazo (ap.4.3)

Método de análisis

Se prepara la mezcla de reacción en un volumen final de 1 ml. Como sustrato fué utilizado el gliceraldehido. Las concentraciones finales de los reactivos en el ensayo fueron 1 mM de gliceraldehido, 73 μ M de NADPH+, 5 mM de mercaptoetanol, 67 mM de tampón fosfato Na-K (pH 6,2) y 10 μ l de hemolizado. El sustrato fué omitido de la cubeta control. La reacción fué lanzada con el sustrato, a 25°C de temperatura. La actividad enzimática de la aldosa reductasa fué indicada por el descenso de las absorvancias del NADPH+ en un tiempo de 30 min., a 340 nm.

Una unidad de actividad enzimática fué definida como la cantidad de enzima que causa oxidación de 1 μ mol de NADPH por min. La actividad específica fué definida como miliunidades por mg. de proteína (mU/mg. prot.)

6.2.2 Acetilcolinesterasa

Se midió siguiendo el método de Beutler basado en el procedimiento de Ellman et al. (55) según el cual, la acetilcolinesterasa cataliza la hidrolisis de acetiltiocolina a tiocolina. Los niveles de producción de tiocolina son medidos siguiendo la reacción de la tiocolina con el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) que produce un color amarillo debido a la formación de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico.

acetilcolinesterasa

Acetiltiocolina iodada -----> tiocolina + acetato

acetato + DTNB -----> ácido 5-Tio-2-nitrobenzoico
+ Tiocolina oxidada

Reactivos

- 1) Tampón fosfato 60,7mM, pH 7,7
- 2) 5,5'ditiobisnitrobenzoato 1,5 mM
- 3) Acetiltiocolina 10mM

Muestra analizada

Hemolizado de hematíes 1:100 (v/v) en tampón fosfato 3 mM, pH 7,5. Congelado a -18°C y posteriormente descongelado a 25°C

Método de análisis

La medida de la actividad se realizó en un volumen final de 1 ml y las concentraciones finales de los reactivos fueron: 50 mM de tampón fosfato, 0,25 mM de 5,5'ditiobisnitrobenzoato, 500 μM de acetiltiocolina y un volumen de 10 μl de hemolizado. Como sustrato se utilizó la acetiltiocolina. La cubeta control no contenía sustrato. La mezcla antes de lanzar la reacción se incubó a 25°C durante 30 min. y se inició la reacción añadiendo el sustrato. Se midió la actividad enzimática a 412 nm en los tiempos 0 y a los 30 min. La actividad enzimática específica es definida en mU por mg de proteínas.

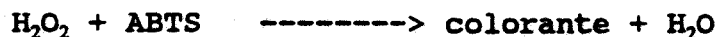
6.3 GLUCOSA PEROXIDASA

Esta técnica se basó en el método seguido por Werner, W., H.-G. Rey y H. Wieliger, Z. (56). El test se fundamenta en las siguientes reacciones:

GOD



POD



* ABTS = 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6)]-sal diamónica.

Reactivos

Se utilizó el Kit test-Combination Glucosa, comercializados por Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica.

- 1) Glucosa estándar a una concentración de 0,505 mmol/l
- 2) Solución de trabajo: formada por tampón fosfato 100 mM pH 7,0 + POD a 0,8 U/ml + GOD a 10 U/ml + ABTS 1,0 mg/ml

* ABTS: cromógeno

Muestra analizada

Se empleó suero de pacientes en ayunas y obtenido según la técnica explicada anteriormente en apartado de muestras analizadas (4.2).

Método de análisis

En la prueba se preparó una cubeta para el blanco que contenía 0,1 ml de agua destilada y 5 ml de la solución de trabajo, una cubeta para la solución standard conteniendo 0,1 ml de glucosa y 5 ml de la solución de trabajo; una cubeta para las distintas muestras con 0,1 ml de la muestra problema y 5 ml de la solución de trabajo.

Una vez, mezcladas las soluciones se incubaron durante 25-50 min. a 20-25°C. Se midieron las extinciones de las muestras y del standard frente al valor blanco, a una longitud de onda de 436 nm.

El cálculo de la concentración de glucosa (c) se hizo según :

$$c = 100 \times \frac{\text{Extinción de muestra}}{\text{Extinción de standar}} \text{ [mg/dl]}$$

6.4 FRUCTOSAMINA

Esta prueba colorimétrica para determinar las proteínas glicosiladas se realizó siguiendo el método de Johnson et al. (38), basado en la propiedad de las cetoaminas para reducir el azul de nitrotetrazolio (NBT) en medio alcalino. La velocidad de formación del formazano es directamente proporcional a la concentración de fructosamina y se mide fotométricamente a 550 nm.

Se utilizó como reactivo Fructosamina "Plus" Roche, de Roche Diagnosticos.

Reactivos

- 1) Tampón carbonato tensioactivo 0.2 M, pH 10,3
- 2) NBT 0,48 mM + uricasa 2,5 KU/1
- 3) Calibrador :polylysina glicada + suero humano glicado con C-glucosa 404 μ M
- 4) Solución de trabajo:Tampón carbonato tensioactivo 0,2 M, pH 10,3 + NBT 0,48 mM + uricasa 2,5 KU/1

Muestra analizada

Se utilizó suero humano según técnica explicada anteriormente en apartado 4.2

Metodo de análisis

El ensayo se realizó en un volumen final de 1,05 ml. Se utilizó una cubeta control con 1 ml de solución de trabajo y 50 μ l de agua, una cubeta con 1ml de solución de trabajo y 50 μ l del calibrador y, para cada muestra, una cubeta con 1 ml de

solución de trabajo y 50 μ l de suero. Una vez mezcladas, se incubaron durante 10 min. a 37°C, midiéndose las absorbancias y tras 5 min. más de incubación se volvieron a medir las absorbancias.

La fructosamina se determinó en μ mol/l y el cálculo se efectuó dividiendo las diferencias de las absorbancias del test entre las diferencias de las absorbancias del calibrador y todo ello multiplicado por la concentración del calibrador.

El rango de normalidad provisional para la fructosamina se encuentra en 285 μ mol/l

6.5 MICROALBUMINURIA

Es un método inmunturbidimétrico desarrollado por Keen y Chlouverakis (32), basado en el principio de que cuando la albúmina humana a analizar reacciona con su Ac específico, en presencia de polietilenglicol, se forman rápidamente inmunocomplejos precipitantes. Si hay un gran exceso de Ac, estos precipitados dan lugar a una turbidez que está en relación con la concentración de la albúmina en la muestra. La turbidez se mide fotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. Con las absorbancias obtenidas en el análisis de una serie de calibradores se construye una curva de calibración, de la cual se deriva la concentración de proteínas en la muestra.

Reactivos

Se utilizaron reactivos Urin-Pack inmuno, Microalb, comercializados por Bayer Diagnosticos Ames.

1) Reactivo de Anticuerpo: Antisuero (cabra) específico contra albúmina humana, en tampón Tris 0,05 M; pH 7,0, conteniendo 40 g/l de polietilenglicol 6000, 2 g/l de tensoactivo y 1 g/l de azida sódica.

2) Calibrador: Albúmina humana en solución salina fisiológica conteniendo 5 g/l de gelatina y 1 g/l de azida sódica. La

concentración de la albúmina es de 160 mg/l. Se preparan 5 diluciones seriadas: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, que corresponden a concentraciones de 80, 40, 20, 10 y 5 mg/l de albúmina

3) Solución de PEG: 40 g/l de polietilenglicol 6000 (PEG) en tampón Tris 0,05 M; pH 7,0, conteniendo 2 g/l de tensoactivo y 1 g/l de azida sódica.

4) Diluyente: 9 g/l de ClNa, 5 g/l de gelatina y 1 g/l de azida sódica.

Muestra analizada

Orina obtenida según procedimiento explicado en material analizado (4.4).

Método de análisis

El ensayo se realizó en un volumen final de 1,10 ml. Se preparó una cubeta control de los calibradores que contenía 500 μ l de solución PEG, 500 μ l de solución de anticuerpos y 100 μ l de solución diluyente; una cubeta para cada uno de los 5 puntos de calibración considerados, que contenían respectivamente 100 μ l de las diluciones seriadas de los calibradores, 500 μ l de solución de anticuerpo y 500 μ l de PEG; una cubeta control de muestras (una cubeta para cada muestra), conteniendo 100 μ l de muestra, 500 μ l de solución PEG y 500 μ l de diluyente; una cubeta en la que se mezcló 100 μ l de muestra, 500 μ l de solución de anticuerpos y 500 μ l de solución PEG.

Se dejó incubar a temperatura ambiente entre 10 y 20 min. Luego se midieron las absorvancias frente a la cubeta control de calibradores.

Los cálculos se realizaron confeccionando una curva de calibración con las diferencias de las absorvancias de los calibradores de trabajo en eje de ordenadas y las concentraciones de albúmina en eje de abscisas. La concentración de albúmina de las muestras se realizó obteniendo la diferencia de las absorvancias entre la muestra y el blanco de muestra y marcándose en el eje de ordenadas, buscando el punto de

insercción en la curva de calibración, llevándose hasta el eje de abscisas donde se determinó el valor de la concentración de albúmina.

Los valores normales de microalbuminuria encontrados en la literatura son de aproximadamente 20 mg/L (20-200 $\mu\text{g}/\text{min}$) (30,31).

6.6 TRANSFERRINA

Es una técnica inmunoturbidimétrica basada en el método desarrollado por Heidelberger y Kendall (57). Esta técnica hace una medida turbidimétrica de los complejos antígenos-anticuerpos. Cuando el anticuerpo reacciona con la transferrina humana en solución diluida, se forman los complejos insolubles y pueden ser cuantificados por la turbidez que producen. Uno de los reactivos (anticuerpos) se encuentra a concentración constante, la cantidad de complejos formados varía en proporción directa a la cantidad de transferrina analizada. La turbidez es medida a 340 nm. Para acelerar la velocidad de formación de los complejos antígeno-anticuerpo, se usa polietileno glicol (PEG) en la fórmula del reactivo antisuero de trabajo.

Reactivos

Para este ensayo fueron utilizados reactivos Technicon.

- 1) Antisuero transferrina (anticuerpo): Contiene antisuero de transferrina antihumano, procedente de sangre caprina y azida de sodio al 0,1%
- 2) Diluyente de las proteínas específicas del antisuero: contiene 0,15 M, pH 7,5 de sodio clorhidro, 4% de polietileno glicol, preservativo y surfactante.
- 3) Proteínas específicas del suero de referencia (standar): formadas a partir de un pool de suero humano que contiene proteínas específicas y azida de sodio al 0,1%
- 4) Diluyente de las proteínas específicas de la muestra: sodio

clorhidro 0,15 M, pH 7,5, preservativo y surfactante.

Muestra utilizada

Suero de pacientes diabéticos y no diabéticos que se obtuvo como se expuso en el apartado 4.2

Método de análisis

Se realiza una curva estándar de 6-7 puntos de concentraciones de transferrina conocida. Utilizando el reactivo proteínas específicas del suero de referencia y el diluyente de las proteínas específicas de la muestra.

niv.stdr	stand.	diluyente
100%	200 μ l	-
75%	150 μ l	50 μ l
50%	100 μ l	100 μ l
25%	50 μ l	150 μ l
12,5%	25 μ l	175 μ l
0%	-	200 μ l

En el ensayo, se utiliza una mezcla de 100 μ l de muestra y 25 μ l reactivo antisuero + 4 ml de diluyente del antisuero, después de un periodo de incubación de 5 min a 30°C, se miden las absorbancias de la solución analítica. Las variaciones de muestra a muestra son corregidas mediante una cubeta blanco que contiene diluyente del antisuero.

La medida de transferrina se hace en mg/dl; los valores aproximados en suero se encuentran entre 200 y 400 g/dl.

La medida de este parámetro fue realizada en los autoanalizadores del departamento de bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena.

6.7 ANTICUERPOS ANTIINSULINA.

Es una técnica de radioinmunoanálisis. Se basa en que la presencia de anticuerpos antiinsulina en el suero de diabéticos tratados es apreciado a partir de la determinación del porcentaje de ligazón de la insulina marcada con I-125 por la fracción de inmunoglobulinas del suero.

Esta determinación es efectuada en dos tiempos:

- 1) Incubación in vitro de la muestra de suero en presencia de I-125-insulina. En el curso de esta incubación, una parte de la I-125-insulina se une a los lugares de unión de los anticuerpos antiinsulina del suero.
- 2) Separación de la fracción de I-125-insulina unida de la fracción libre, por un método de doble anticuerpo modificado: la inmunoprecipitación es obtenida por introducción en el medio de incubación de suero humano tratado con carbón, de suero anti-Ig G humano y de polietileno-glicol (PEG).

Después de centrifugar, el conteo de la radiactividad de la fracción libre permite el cálculo del porcentaje de I-125-insulina unida correspondiente a cada suero.

Reactivos

Fueron utilizados Kit comercializados por Biomerieux (Francia)

- 1) I-125-insulina: insulina porcina marcada con Iodo 125 $< 3,2 \mu\text{Ci}$ ó 118 Kbc (actividad específica) + fosfato de sodio + albúmina bovina + colorante azul + 2,5 ml de agua destilada.
- 2) Suero humano tratado con carbón + 1,5 ml de agua destilada.
- 3) Anti-IgG humana: suero de cabra anti-IgG total humano + 2,4 ml de agua destilada.
- 4) PEG 6000 al 24% + agua destilada para 100 ml

Muestra analizada.

Fué utilizado suero de pacientes diabéticos insulino-dependientes, obtenido en ayunas ante de la inyección de

insulina.

Método de análisis

1ª fase de incubación del suero a medir con I-125-insulina:

El orden de pipeteo de las soluciones debe ser:

- 1) suero humano tratado con carbón.
- 2) muestras de suero.
- 3) solución de insulina marcada con I-125.

TABLA 1 1ª Fase de la incubación del suero con I-125-insulina

tubos de incubación	*suero humano ttdo con carbón	muestra (ml)	sol. 125-I-insulina (ml)
suero 0	0,05	-	0,2
problemas	-	0,05	0,2

* solución pipeteada en la cubeta en ml.

Una vez que se han preparado los tubos con sus respectivas soluciones se agitan y se cubren con parafilm, y se dejan incubar durante 12-24h, a una temperatura de +4°C

En la fase de inmunoprecipitación se colocan 3 tubos T para la actividad total, 3 tubos para la actividad no específica N y tubos por duplicado para cada muestra.

TABLA 2 Fase de inmunoprecipitación

tubos	suero 0 (ml)	muestra (ml)	** suero humano ttdo con carbón	suero anti-IgG humano (ml)	*	sol. PEG (ml)
act. total T	0,03	-	-	-		-
act.no espec N	0,03	-	0,05	0,1		3
problem	-	0,03	0,05	0,1		3

* Se realiza una agitación manual energética durante 20 seg.

** Solución pipeteada en la cubeta en ml

Una vez que se ha añadido el polietilén-glicol, se agitan los tubos y se dejan incubar 30 min. a temperatura ambiente.

Posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 2500-4000 rpm. Se decanta el sobrenadante y se realiza el conteo de la radiactividad de la I-125-insulina ligada contenida en los tubos.

El cálculo de la radiactividad se realiza:

1) Se hace la media de todos los conteos para cada grupo de tubos.

2) Se calcula el porcentaje de la actividad no específica (N):

$$\frac{N}{T} \% = \frac{\text{ipm media N}}{\text{ipm media T}} \times 100$$

4) Se determina el porcentaje de ligasón $\frac{B-N}{T}$ % de cada muestra:

$$\frac{B-N}{T} \% = \frac{\text{ipm media problemas} - \text{ipm media N}}{\text{ipm media de T}} \times 100$$

Los porcentajes de ligasón de la I-125-insulina considerados como normales son de un 0,25%

La cuantificación de la hemoglobina glicosilada se realizó por cromatografía de intercambio iónico en el departamento de bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena. Colesterol, triglicéridos, proteínas del suero y albúmina, fueron medidos en autoanalizadores (Smac-20) en el departamento de bioquímica de este mismo hospital.

IV RESULTADOS

1. RELACIÓN DE LA FRUCTOSAMINA CON OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LA DIABETES TIPO II

En una población de 48 diabéticos no insulín-dependientes de diagnóstico reciente, se realizó el estudio de la fructosamina, entendida como conjunto de proteínas glicosiladas del suero que representan las glucemias medias en un periodo de 2-3 semanas. Posteriormente, esta población se dividió en dos grupos: uno con la concentración de fructosamina dentro del rango de normalidad y un segundo grupo con dicha concentración elevada. En ambos grupos se compararon los parámetros clínicos que se enumeran a continuación: glucemia basal, hemoglobina glicosilada, proteínas del suero, albúmina, microalbuminuria, colesterol y triglicéridos.

1.1 Fructosamina, glucemia basal y hemoglobina glicosilada.

Se determinaron los valores de la fructosamina frente a los de la glucemia basal (Fig.1). Se encontró que la fructosamina estaba elevada en el 35,5% de los diabéticos (fig.2). Y en el estudio de las dos poblaciones de diabéticos con distintos niveles de fructosamina, se observó que un 13% de los diabéticos con rango fisiológico de fructosamina presentaban niveles de glucemia elevados, y el 41% de los diabéticos con la fructosamina por encima de los valores normales presentaron tasas altas de glucemia (fig.3).

Asimismo, se analizaron los niveles de Hb A_{1c} en esta misma población de 48 diabéticos (no insulín-dependiente) y se relacionaron con los valores de la glucemia basal (fig.4) y con los niveles de fructosamina (fig.5). Se pudo apreciar que la Hb A_{1c} se encontraba dentro del rango fisiológico en todos los casos estudiados.

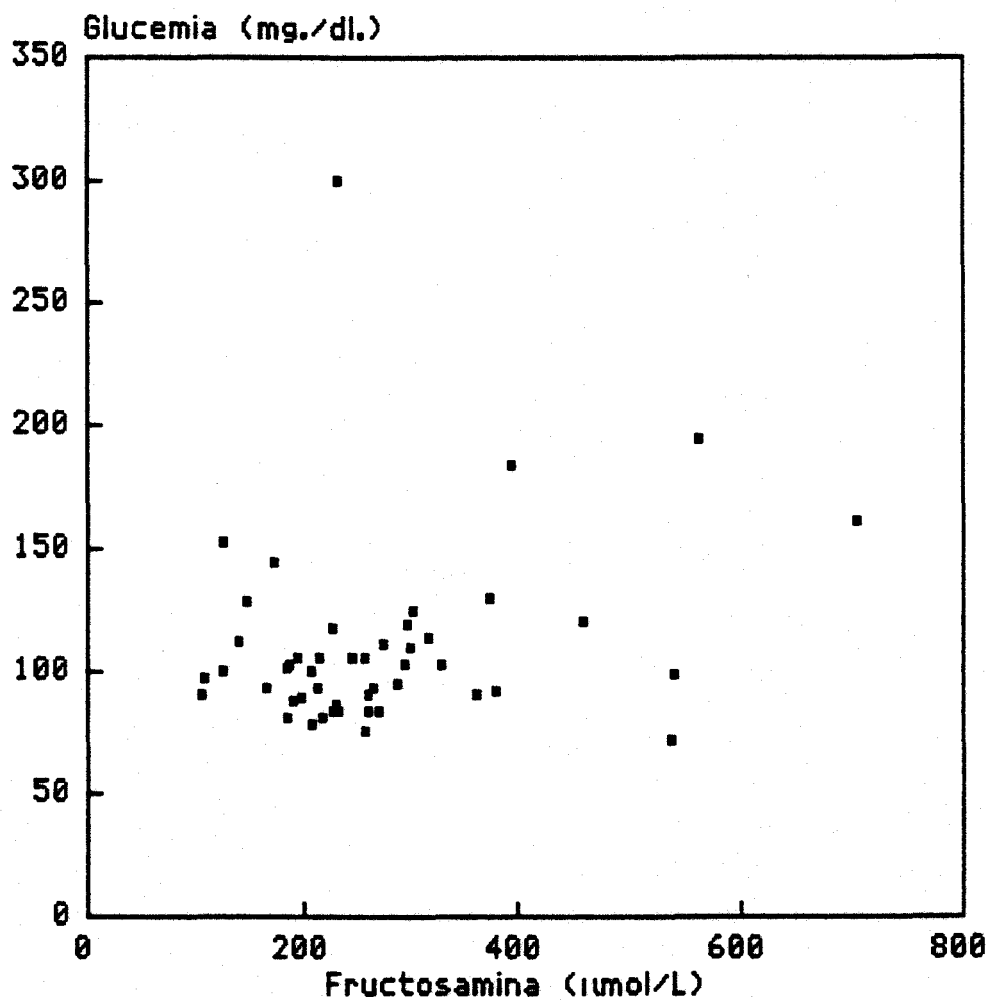


Fig.1 Fructosamina y glucemia basal

Estos parámetros se estudiaron en una población de 48 diabéticos no insulín-dependiente (tipo II). El rango fisiológico de la fructosamina alcanza valores máximos de 285 $\mu\text{mol/L}$ y el de la glucemia oscila entre 80-120 mg/dl.

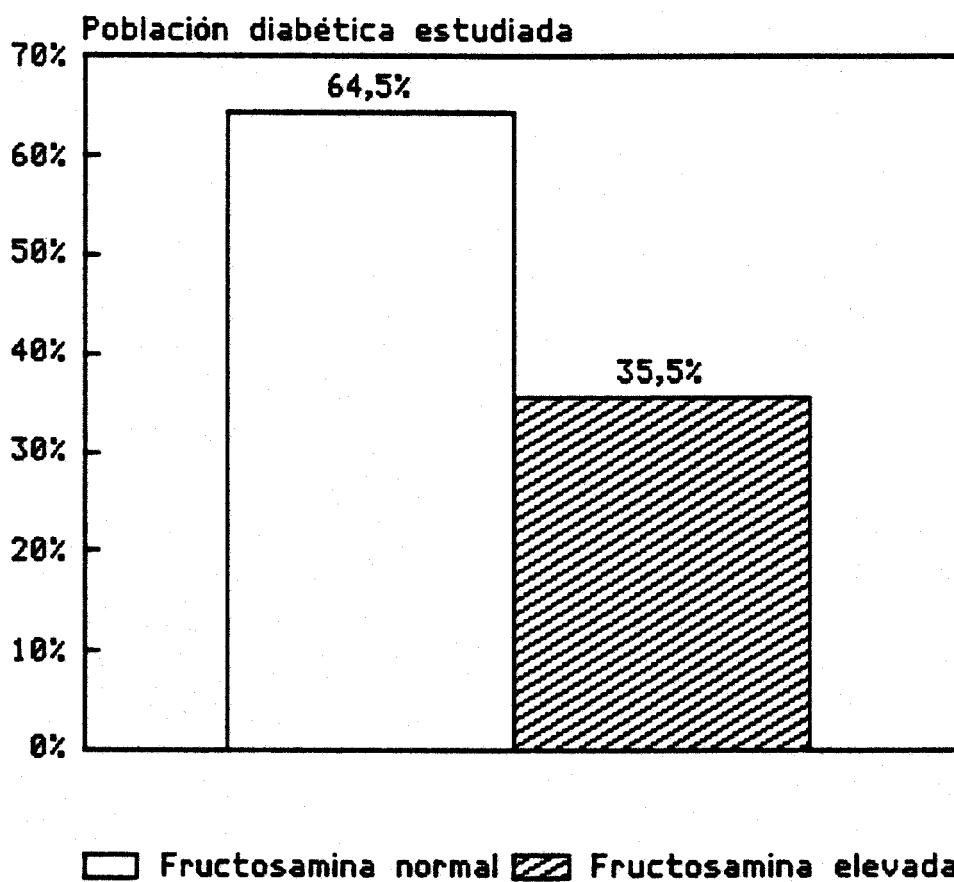


Fig.2 Concentración de fructosamina en la población diabética estudiada.

En la fig. se muestra la concentración de fructosamina en una población de 48 diabéticos no insulín-dependiente. Se encontró que el 35,5% de los diabéticos presentaban concentraciones de fructosamina elevada.

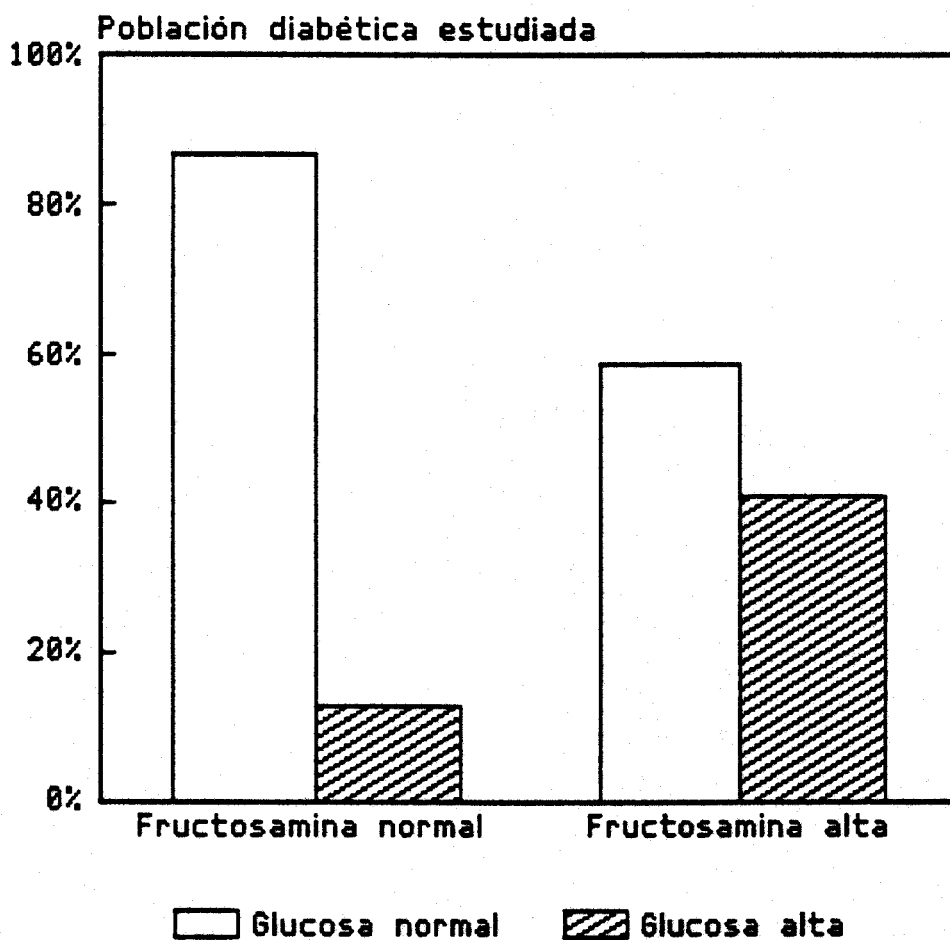


Fig.3 Glucemia basal en la población diabética dependiendo de la concentración de fructosamina.

Se realizó el estudio de la glucemia basal en un grupo de diabéticos no insulín-dependientes con la fructosamina en el rango fisiológico (n=31) y otro grupo de diabéticos no insulín-dependientes con la concentración de fructosamina elevada (n=17).

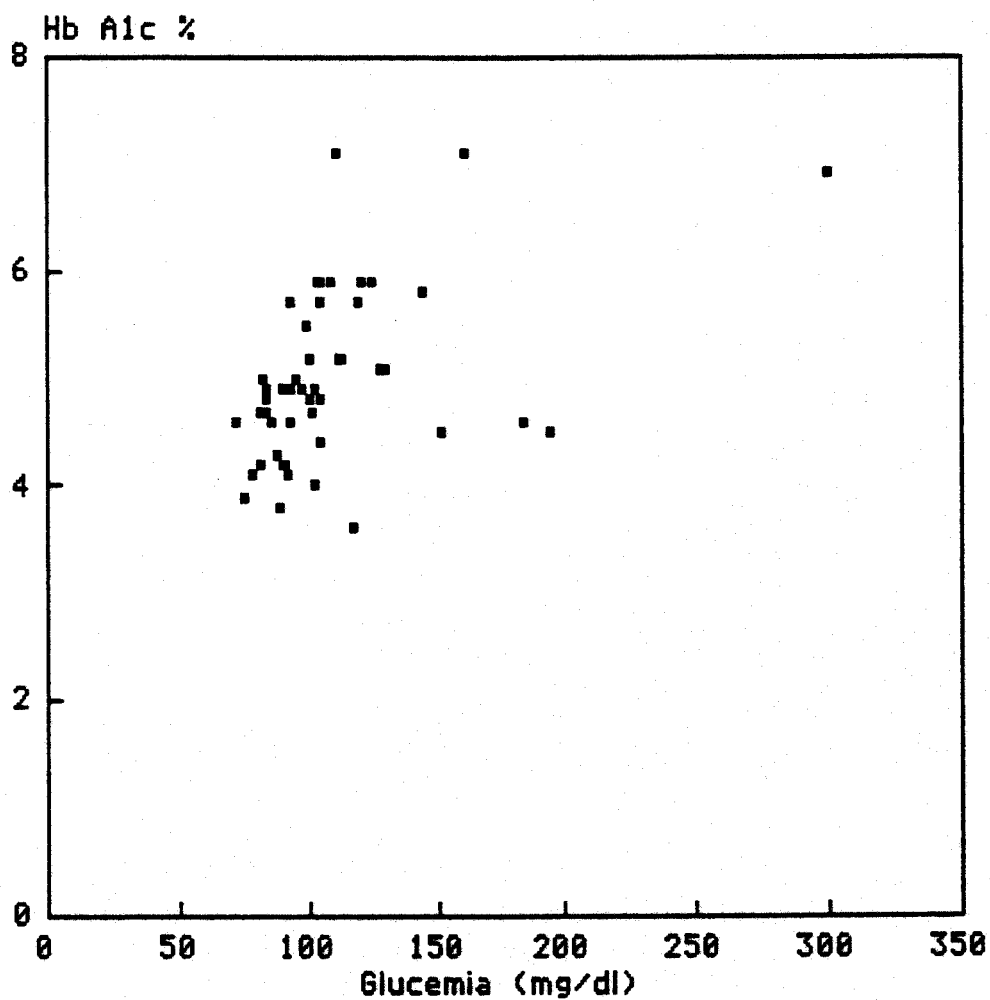


Fig.4 Hemoglobina glicosilada y glucemia basal

Se muestran los niveles de hemoglobina glicosilada (Hb A_{1c}) y los de glucemia en una población de 48 diabéticos no insulín-dependiente. El rango fisiológico de la hemoglobina glicosilada se encuentra entre 4,5-7,5% y el de la glucemia entre 80-120 mg/dl

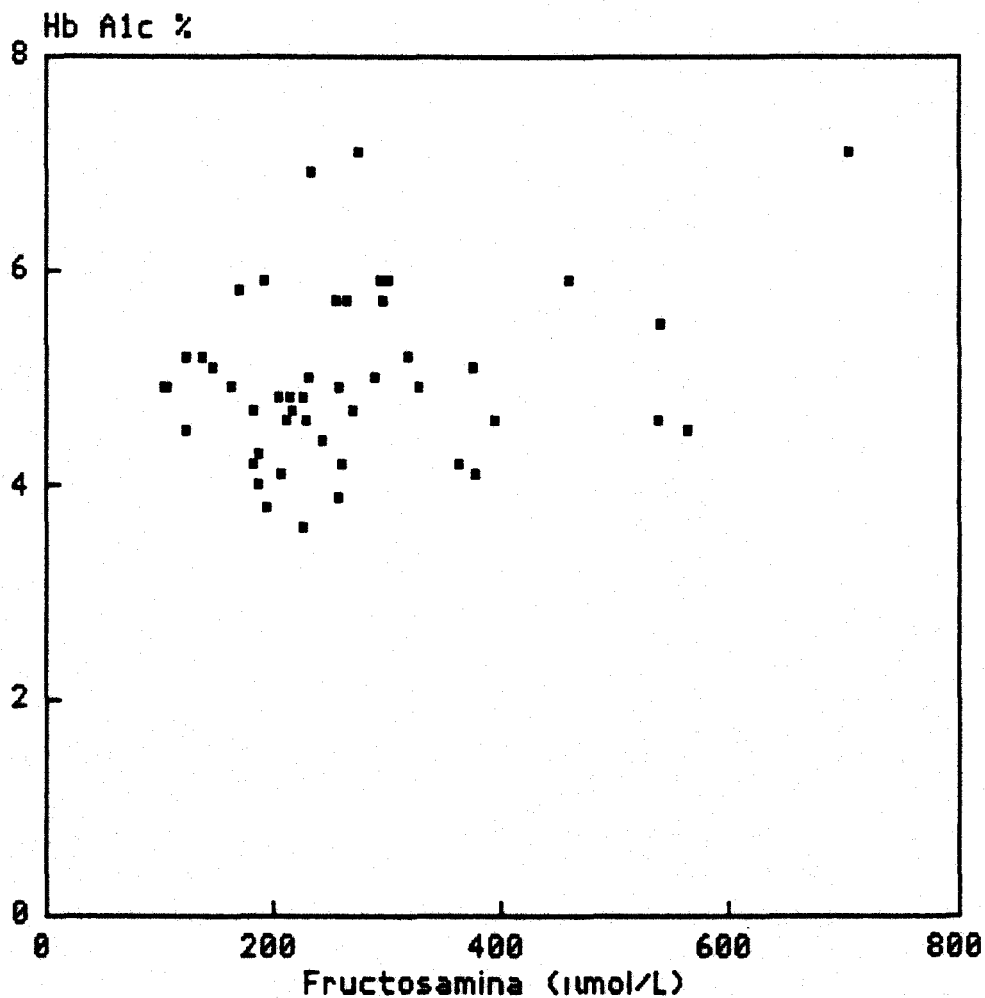


Fig.5 Fructosamina y hemoglobina glicosilada

En la figura se representan los valores de fructosamina y hemoglobina glicosilada (Hb A_{1c}) en una población de 48 diabéticos no insulín-dependiente. el rango de normalidad de la fructosamina alcanza valores de 285 µmol/L y el de la Hb A_{1c} oscila entre 4,5 y 7,5.

1.2 Fructosamina y proteínas totales

Se midió la concentración de proteínas totales y de fructosamina en suero (Fig.6), ya que parece existir una relación lineal entre la concentración de proteínas y el grado de glicosilación de las proteínas del suero.

Como se observa en la Fig.6, la concentración de proteínas se encontró en límites fisiológicos en todos los diabéticos estudiados.

También se examinaron los niveles de albúmina sérica, como proteína del suero que puede interferir en la determinación de las tasas de fructosamina y, al igual que las proteínas, se encontró que se hallaban dentro del rango de normalidad en todos los casos (Fig.9).

1.3 Fructosamina y microalbuminuria

Se correlacionó la microalbuminuria con la fructosamina (Fig.7), debido a la importancia de la primera como parámetro clínico para la detección precoz de la lesión renal diabética y la implicación del mal control metabólico del diabético en la aparición de esta complicación.

Se encontró que la microalbuminuria estaba elevada en el 21% de los diabéticos no insulín-dependiente (n=48). De este grupo un 40% de los pacientes presentaron niveles de glucemia elevados y el 60% mostró cifras de glucemia en límites de normalidad (Tabla 3).

Al comparar los dos grupos de diabéticos con diferentes concentraciones de fructosamina, se pudo observar que la microalbuminuria presentó valores elevados en el 29,4% de la población con altas tasas de proteínas del suero glicosiladas, mientras que mostró concentraciones altas en el 16% de los pacientes con niveles fisiológicos de fructosamina (Tablas 4 y 5).

Posteriormente,comparamos la microalbuminuria y las proteínas del suero (fig.8) y la albúmina sérica (Fig.9).Ambos parámetros presentaron valores fisiológicos para la totalidad de los casos estudiados.No se encontró relación de los niveles altos de microalbuminuria con las concentraciones séricas de proteínas y albúmina.

TABLA 3 Microalbuminuria y glucemia en la población diabética tipo II

	n	% de población
microalb.alta en la población diabética total (n=48)	10	21
microalbumin.alta con glucemia normal	6	60
microalbumin.alta con glucemia alta	4	40

* n:nº de casos encontrados con excreción de microalbuminuria elevada

* Microalbuminuria alta en la población diabética total:microalbuminuria elevada encontrada en toda la población diabética estudiada.

* Microalbuminuria alta con glucemia normal:son los pacientes que muestran la microalbuminuria elevada y la glucemia la presentan dentro de límites fisiológicos.

* Microalbuminuria alta y glucemia alta:población diabética que presenta la excreción urinaria de microalbuminuria elevada y la glucemia muestra valores por encima de los fisiológicos.

% de población:población diabética en % que presenta elevación de la microalbuminuria.

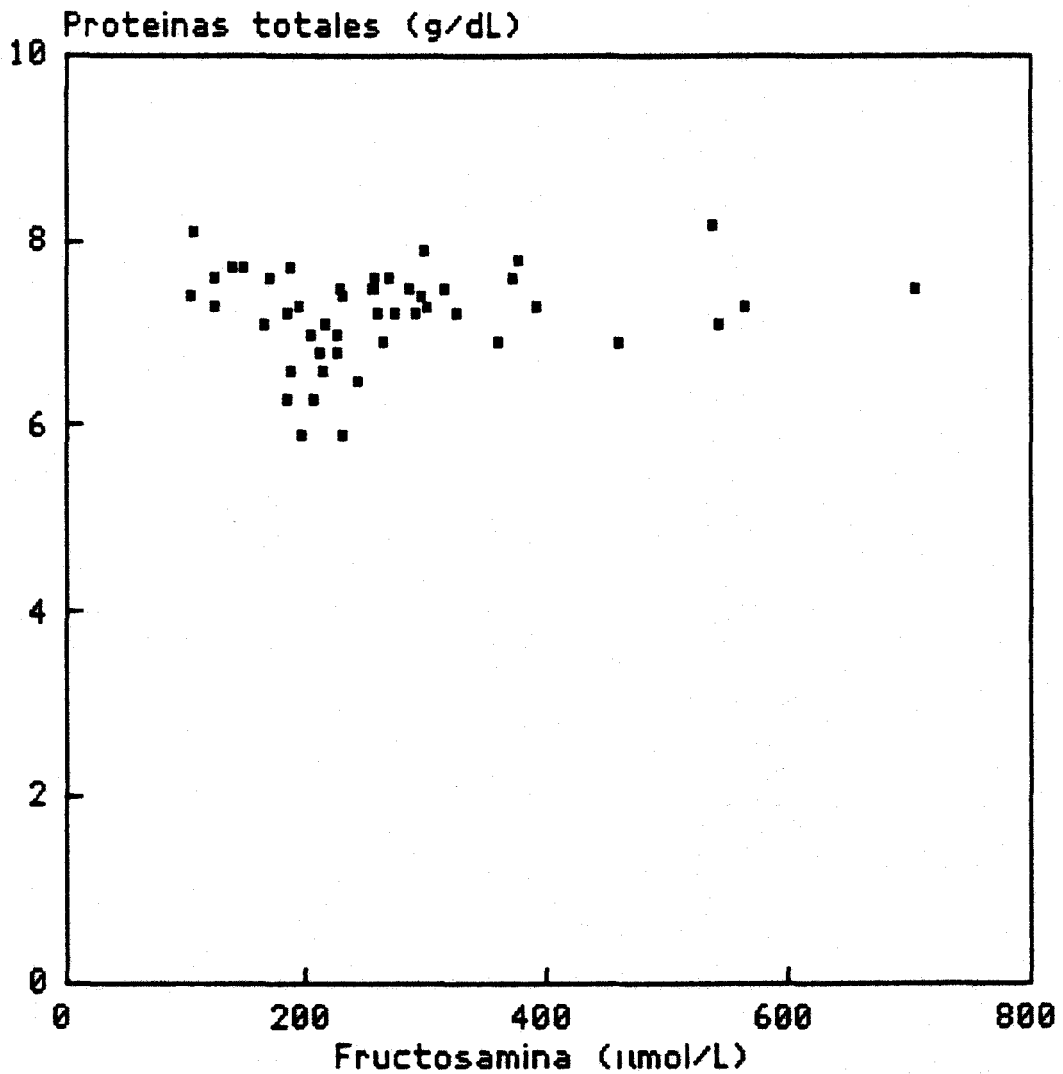


Fig.6 Fructosamina y proteínas totales del suero

En la fig.se representan los valores de fructosamina y proteínas séricas en una población de 48 diabéticos tipo II. Rango fisiológico de las proteínas:6-8 g/dl y el de frctosamina alcanza valores máximos de 285 $\mu\text{mol/L}$.

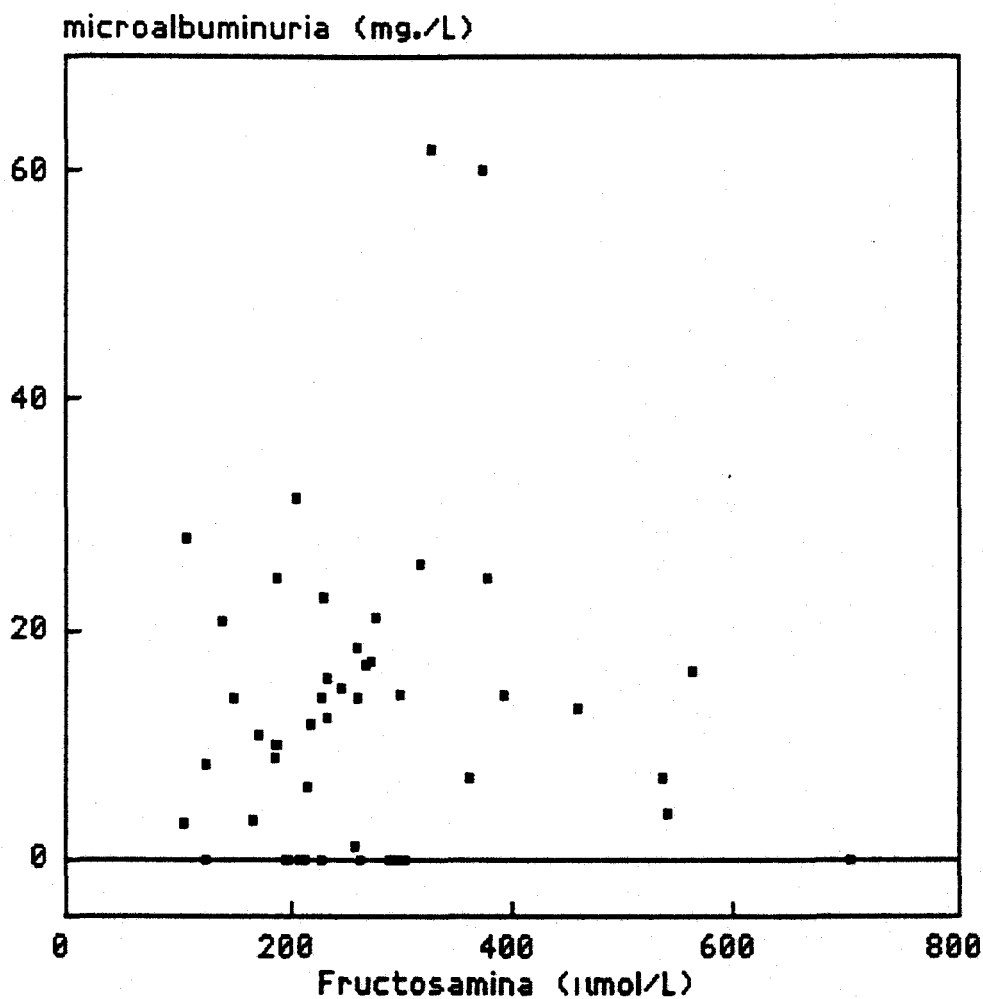


Fig.7 Fructosamina y microalbuminuria.

Se representan los valores de estos parámetros en una población diabética tipo II (n=48).

Los límites fisiológicos de microalbuminuria alcanzan valores máximos de 20 mg/L.

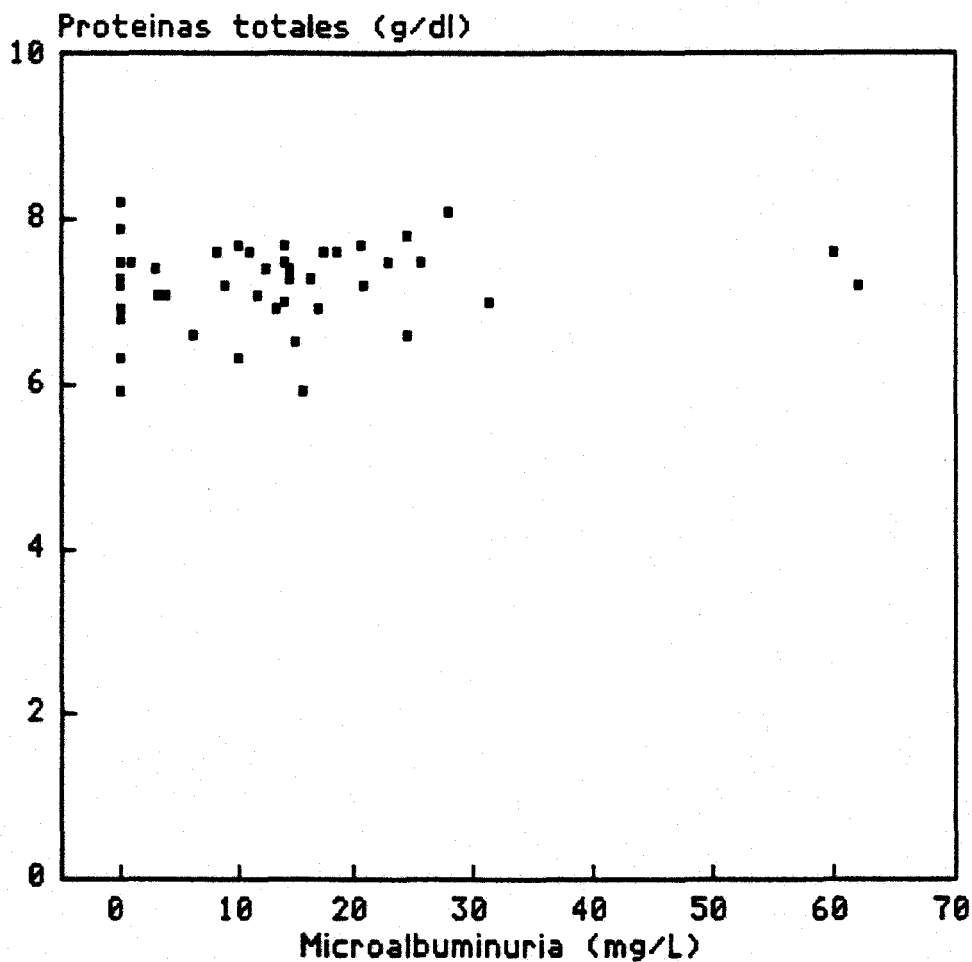


Fig.8 Microalbuminuria y proteínas del suero

Se representan los valores de microalbuminuria y de proteínas séricas en una población diabética tipo II (n=48).

Los límites fisiológicos de la microalbuminuria alcanzan valores máximos de 20 mg/L y las proteínas de 6-8 g/dl.

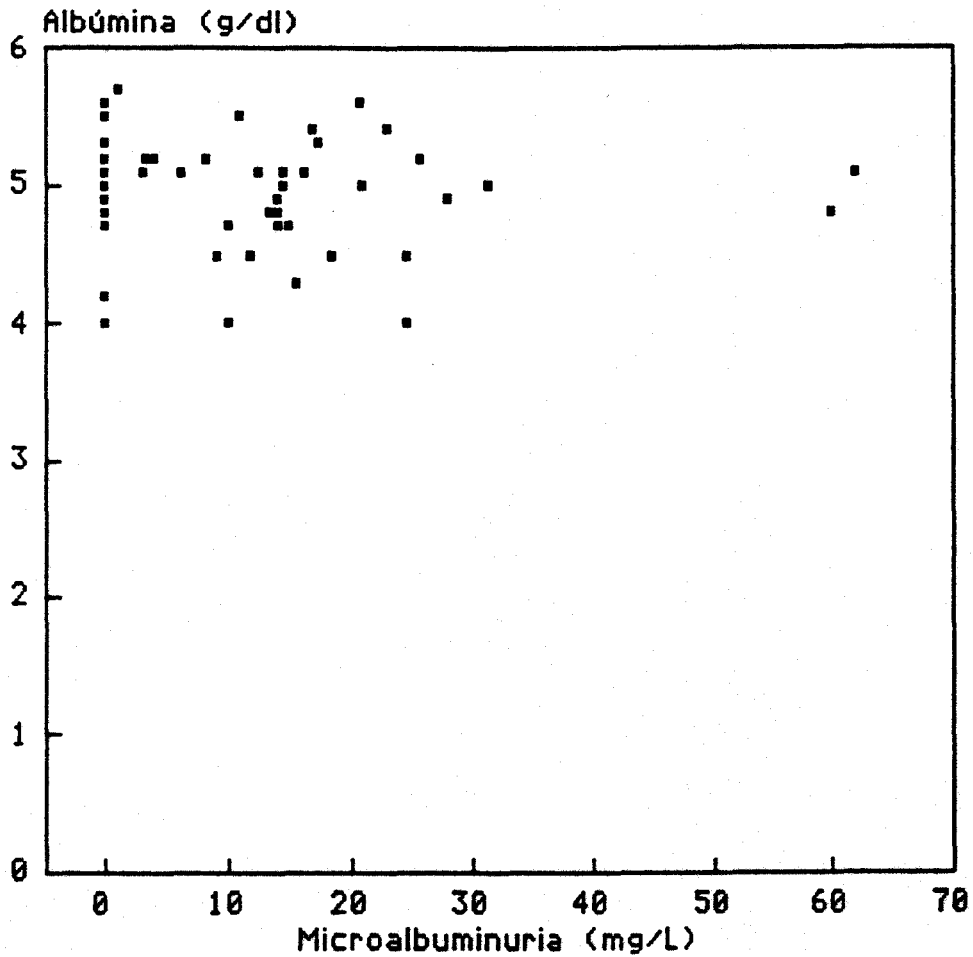


Fig.9 Microalbuminuria y albúmina sérica

El análisis de estos parámetros se realizó en una población diabética tipo II (n=48).

El rango fisiológico para la albúmina oscila entre 3,5-5,5 g/dl



1.4 Fructosamina, triglicéridos y colesterol

También se midieron, en las dos subpoblaciones diabéticas anteriormente citadas, las concentraciones de colesterol (Fig.10) y de triglicéridos (Fig.11) y se relacionaron con los valores de fructosamina. Los valores medios de colesterol y triglicéridos, para ambas poblaciones de diabéticos, se muestran en la tabla 4.

El objeto de este estudio fué comparar los triglicéridos y el colesterol, en relación a la concentración de fructosamina, indicadora del control metabólico del diabético, por su importancia en la aparición de las complicaciones vasculares de la diabetes.

Como se muestra en la fig.12, el nivel de colesterol se encontró elevado en el 64,8% de la población con las tasas de fructosamina alta, frente al 58,1% de la población con la concentración de fructosamina en el rango de normalidad. La diferencia, en los niveles de colesterol, entre las dos poblaciones no es muy amplia.

En la fig.13, se observa que la concentración de triglicéridos se presentó elevada en el 52,8% de la población con niveles de fructosamina altos, mientras que se encontró aumentada en un 29% de la población con tasas de fructosamina en el rango fisiológico. En este caso la diferencia entre ambas poblaciones es notable.

Estos resultados se representan en la tabla 5.

TABLA 4 Concentraciones de colesterol, triglicéridos, glucemia y microalbuminuria en relación a la fructosamina, en diabéticos no insulín dependientes.

diabeticos tipo II	n	colester (mg/dl)	triglicer (mg/dl)	microalbum (mg/L)	glucemia (mg/dl)
fructosam normal 201±9	31	220±9	121±15	11±1	100±7
fructosam elevada 395±50	17	250±4	150±4	16±8	125±10

En esta tabla, se muestran los valores de las concentraciones (media±SEM para $p<0,01$) de fructosamina, glucemia, colesterol, triglicéridos y microalbuminuria, atendiendo a la subdivisión de la población diabética según los valores de fructosamina. Los valores expuestos bajo los epígrafes de fructosamina normal y fructosam elevada corresponden a los valores medios ± SEM de fructosamina.

TABLA 5 Población diabética que presenta los parámetros estudiados elevados, en relación a la concentración de fructosamina

diabeticos tipo II	total %	colest %	Triglic %	microalbum %	glucemia %
poblac total n=48	100	39	37	21	31
fructosam. normal n=31	64,5	58	29	16	13
fructosam. elevada n=17	35,5	65	53	29	41

En la tabla, se presentan los casos que aparecen en la población diabética con los parámetros estudiados elevados, según los valores de la concentración de fructosamina.

* Total: hace referencia al total de la población diabética estudiada (n=48). El 35,5% de los pacientes presentaron los valores de fructosamina elevados.

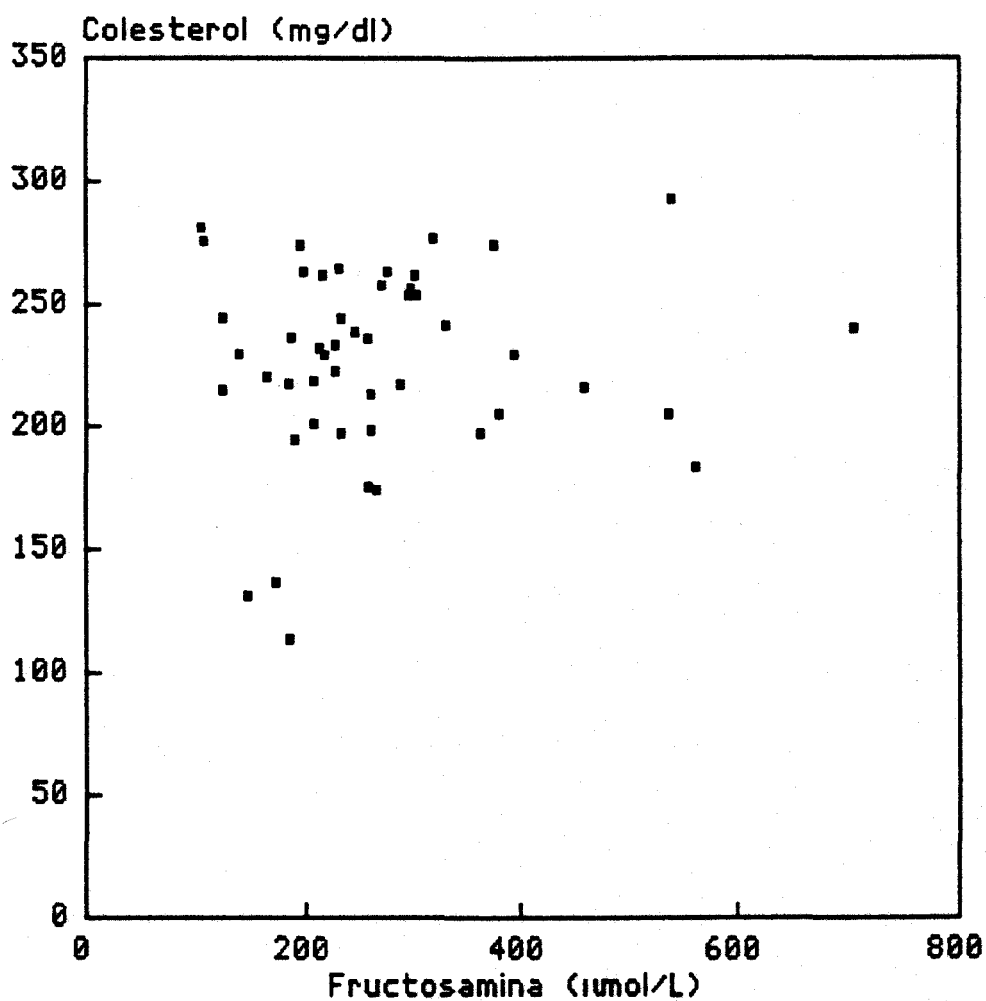


Fig.10 Fructosamina y colesterol

Estos parámetros se determinaron en una población diabética tipo II (n=48).

Los valores fisiológicos del colesterol se encuentran entre 150-220 mg/dl.

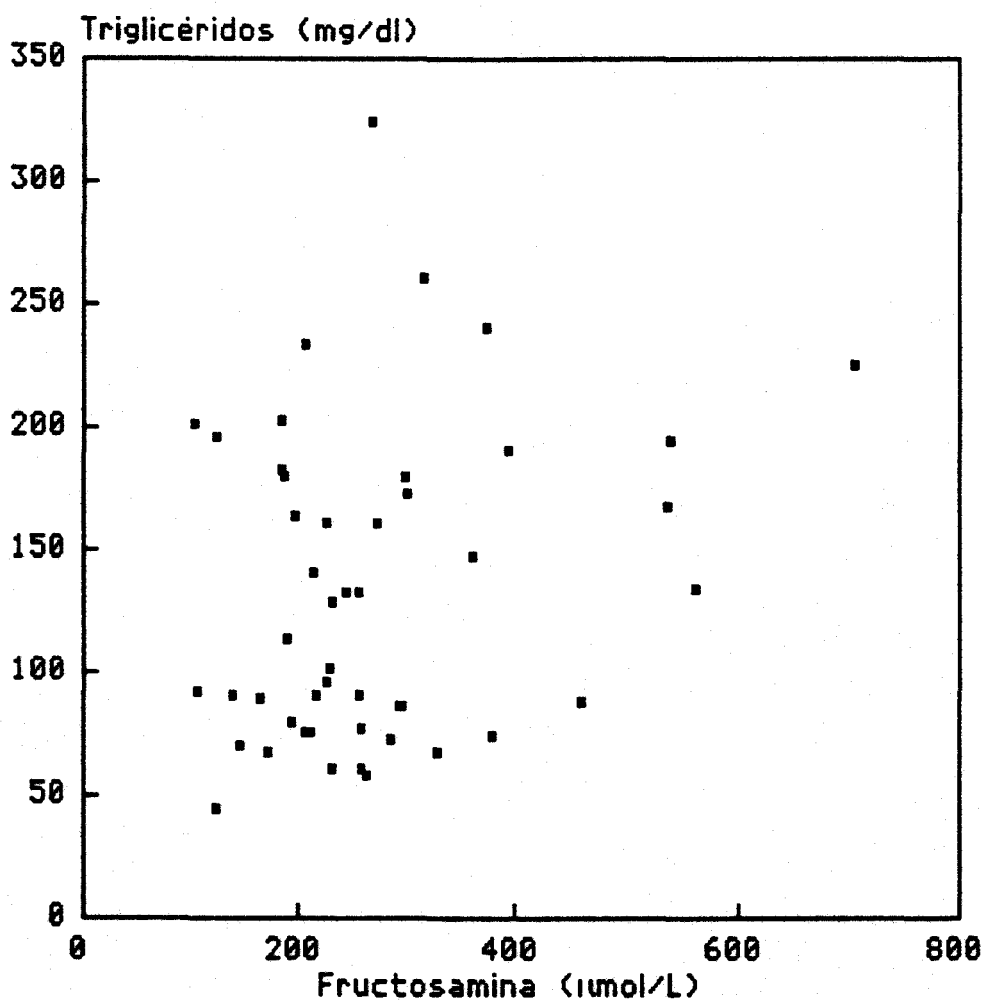


Fig.11 Fructosamina y triglicéridos

Se representan los valores de estos parámetros estudiados en una población diabética tipo II (n=48).

Los límites de normalidad para los triglicéridos se encuentran entre 70-160 mg/dl.

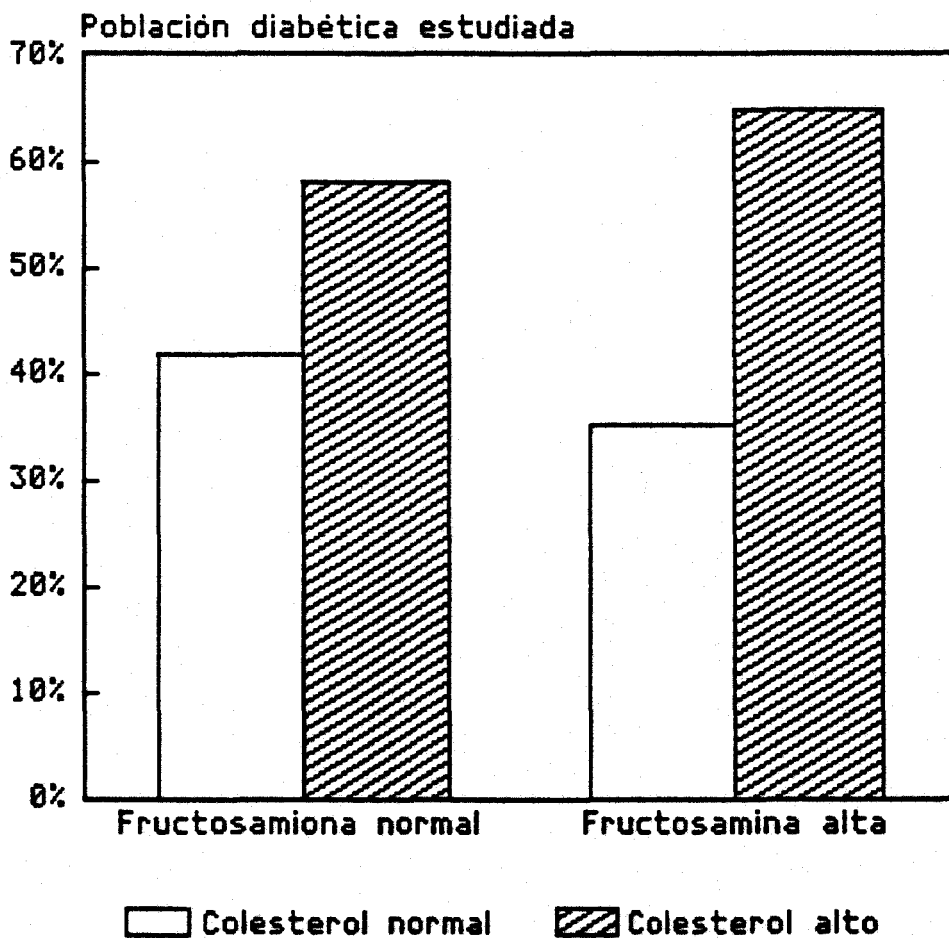


Fig.12 Colesterol en la población diabética (tipo II) en relación a la concentración de fructosamina

Se representa la población diabética con niveles altos y fisiológicos de colesterol según la concentración de fructosamina que presentó.

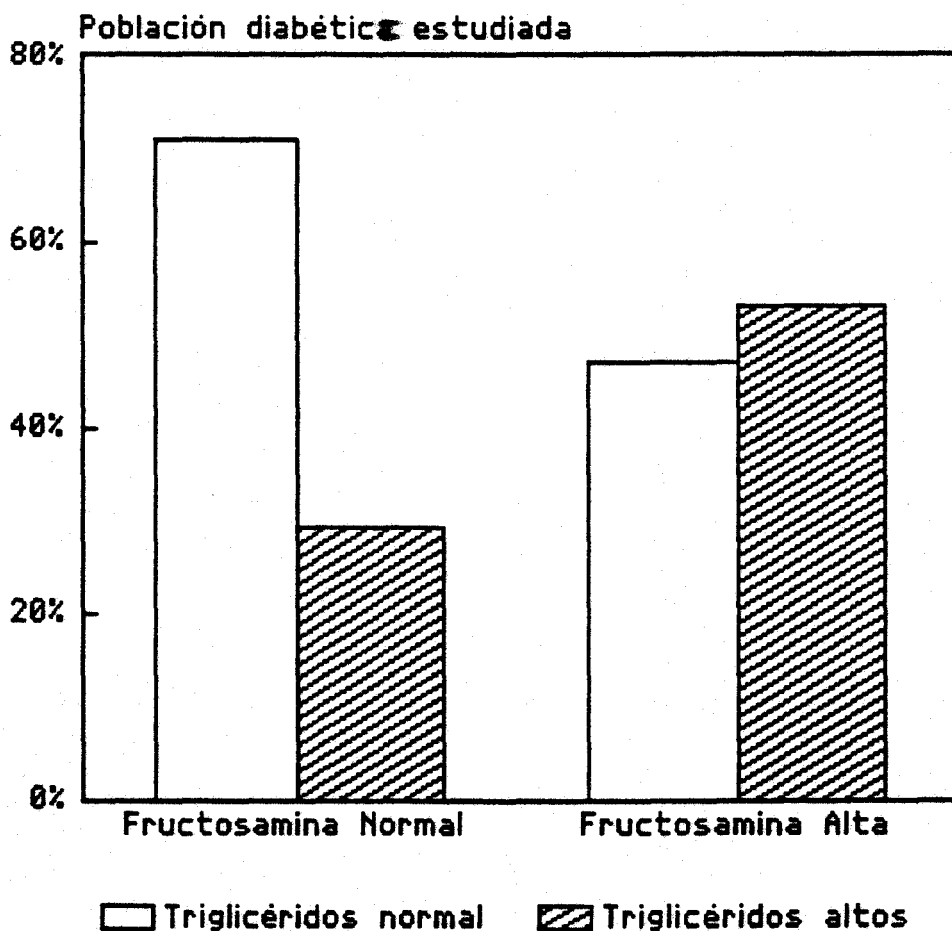


Fig.13 Triglicéridos en la población diabética en relación a la concentración de fructosamina

Se determinaron los niveles de triglicéridos en una población diabética (tipo II) con las tasas de fructosamina en rango fisiológico (n=31) y otra población con niveles de fructosamina elevados (n=17)

2. TRANSFERRINA EN LA DIABETES CLÍNICA

Se midieron los niveles de transferrina en el suero de una población de 61 diabéticos tipo II y 74 no diabéticos. El análisis fué realizado según la técnica explicada en el apartado 6.6 de material y métodos.

El rango de normalidad de la transferrina se encuentra entre 200-400 mg/dl.

Encontramos que en la población no diabética las tasas de transferrina mostraban unos valores medios de 344 ± 9 mg/dl, y el grupo de diabéticos presentó unos niveles medios de 292 ± 9 mg/dl (Tabla 7).

2.1 En la diabetes sin otras patologías asociadas

En el grupo de diabéticos (n=61), se distinguió entre una población de 20 pacientes sin otras patologías asociadas, y en el grupo de no diabéticos (n=74) se distinguió una población de 39 personas sin ningún tipo de patología (sanos).

En la Fig.14, se representan los valores de las concentraciones de la transferrina en suero de diabéticos y sujetos sanos, encontrándose los valores medios de los diabéticos por debajo de los sanos (Tabla 8).

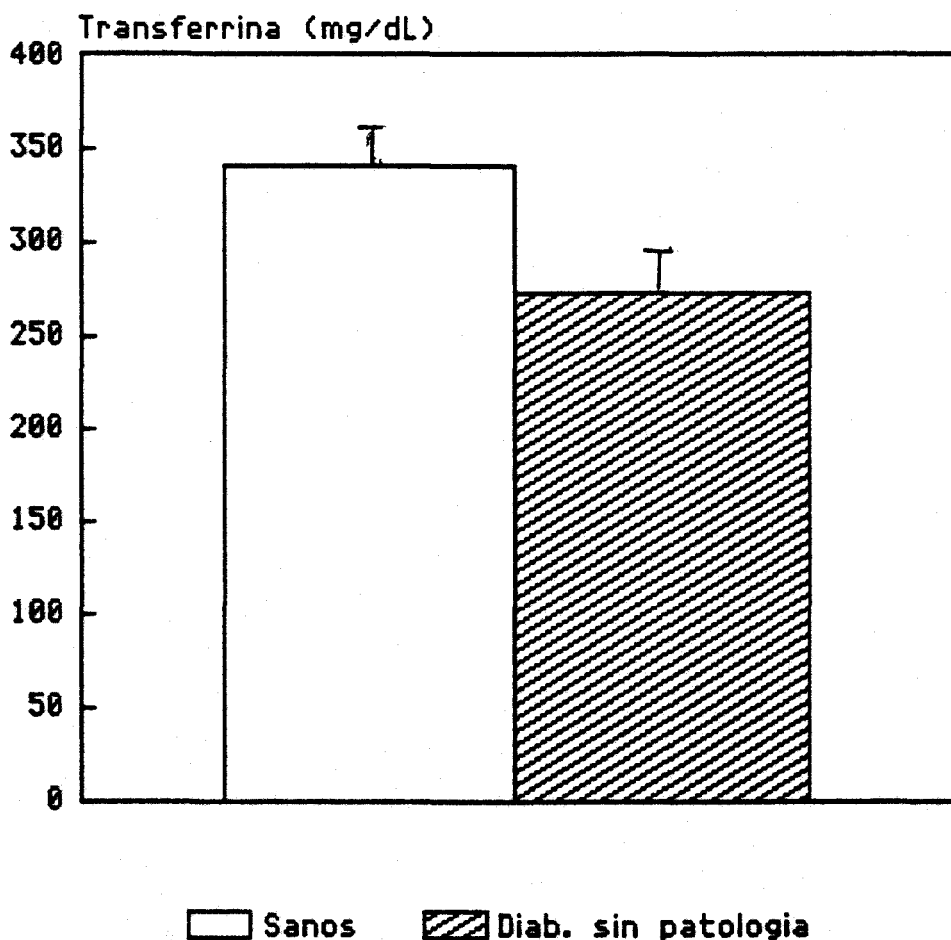


Fig.14 Concentración de transferrina en diabéticos tipo II sin otras patologías asociadas

El estudio se realizó en una población sin ningún tipo de patología (sanos $n=39$) y una población diabética tipo II sin otras patologías asociadas ($n=20$). Los valores obtenidos son la media \pm SEM

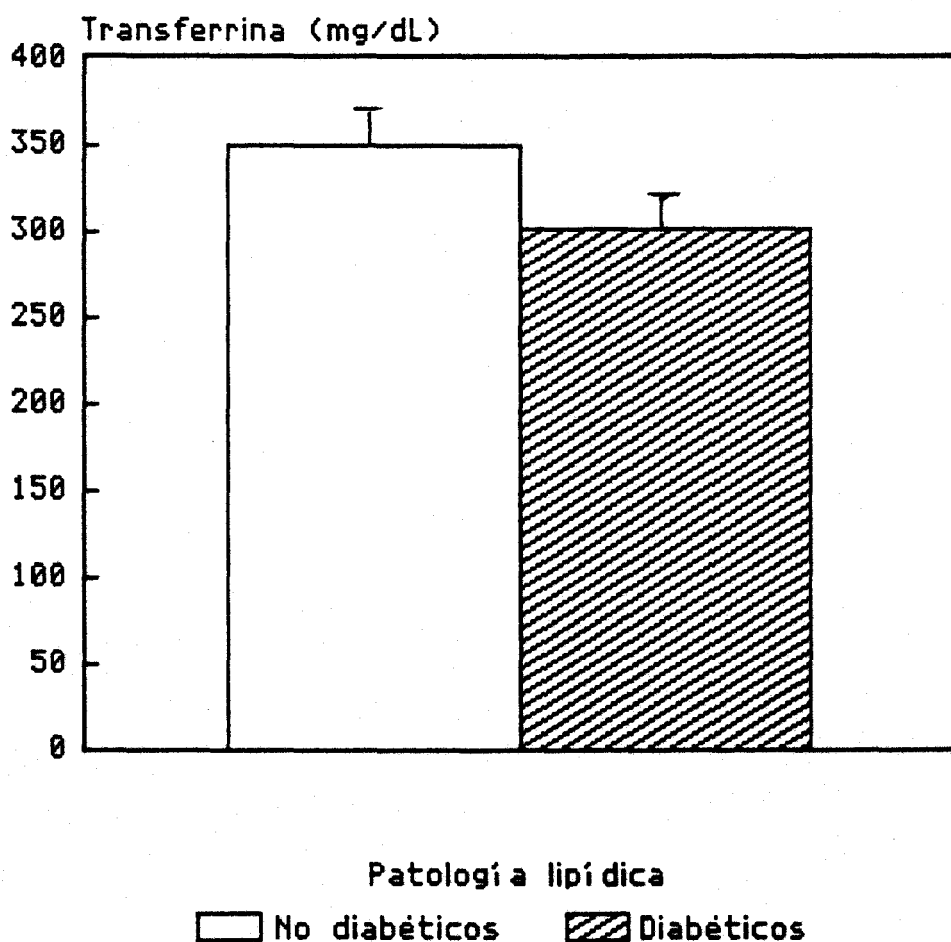


Fig.15 Concentración de transferrina en diabéticos con patología de los lípidos

En la fig.se muestra la concentración de transferrina en pacientes no diabéticos y diabéticos con alteraciones en los lípidos (triglicéridos y colesterol). Los valores obtenidos son la media de las concentraciones de transferrina \pm SEM.

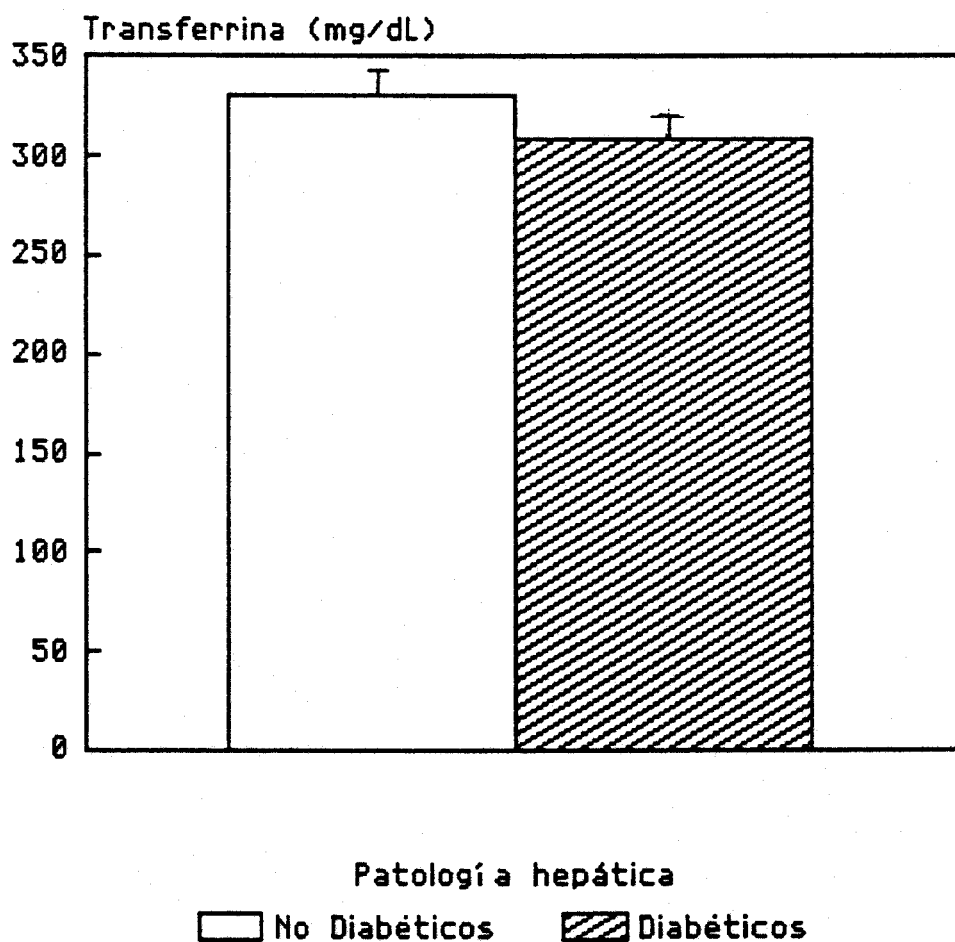


Fig.16 Concentración de transferrina en la población con patología hepática

Este estudio se realizó en una población con alteraciones de la función hepática. En esta población se diferenció entre un grupo de pacientes no diabéticos y otro grupo que tenía asociada la diabetes. Los resultados son la media de los niveles de transferrina \pm SEM.

2.2 En la diabetes con alteraciones hepáticas y lipídicas

Igualmente, se seleccionó un grupo de 46 diabéticos en el que 14 presentaban alteraciones hepáticas y 32 alteraciones de los lípidos; y una población de 38 no diabéticos en la que 13 presentaban alteración de la función hepática y 25 alteraciones de los lípidos.

Los parámetros medidos en la población con patología hepática fueron GOT, GPT, GGT (Tabla 6) y los parámetros analizados en la población con alteraciones de los lípidos: triglicéridos y colesterol (Tabla 7).

Se obtuvieron resultados similares a los encontrados en la población sin otras patologías asociadas (Tabla 8); La concentración de transferrina en suero de diabéticos con alteraciones de los lípidos estaba descendida respecto a los no diabéticos con la misma alteración (Fig. 15); en la población de diabéticos con alteraciones hepáticas se encontró, igualmente, descendida la concentración de transferrina respecto a la población no diabética con patología hepática (Fig. 16).

TABLA 6 Parámetros de la población con patología hepática

pacientes	n	GGT U/l	GOT U/l	GPT U/l
no diabéticos	13	168±30	90±7	176±56
diabéticos	14	531±95	105±35	178±63

Los valores de los parámetros son la media ± SEM para $p < 0,01$.

TABLA 7 Parámetros de la población con alteraciones de los lípidos

pacientes	n	TGC (mg/dl)	colesterol (mg/dl)
no diabéticos	25	182,5±39	264±13
diabéticos	32	244±42	279,9±20

Los valores de los parámetros son la media ± SEM para $p < 0,01$

TABLA 8 Concentración de transferrina en diabéticos no insulín-dependientes (tipo II)

pacientes	n	glucemia (mg/dl)	TFR (mg/dl)
No diabéticos	74	86±3	344±9
diabéticos	61	185±25	292±9
sanos	39	85±0,6	340±11
diabéticos sin otras patolog.	20	191±28	273±18
lípidos alterados	32	87±0,1	350±19
lípidos alterados y diabetes	27	184±15	302±10
alteración hepática	13	83±4	330±28
alt.hepática y diabetes	14	176±32	309±24

* No diabéticos: población sana y población que presenta alteraciones hepáticas y lipídicas sin diabetes asociada.

* Diabéticos: toda la población diabética, la que no lleva asociada patologías y la que presenta alteraciones hepáticas y lipídicas.

* Sanos: sujetos que no presentan ningún tipo de patología

* Diabéticos sin otras patolog.: pacientes diabéticos que no tienen otras patologías asociadas.

* Lípidos alterados: población "no diabética" que presenta alteraciones de los lípidos (triglicéridos y colesterol).

* Lípidos alterados y diabetes: representan la población de "diabéticos" que presentan alteraciones de los lípidos.

* Alteraciones hepáticas: población "no diabética" que presenta alteración de la función hepática.

* Alteraciones hepáticas y diabetes: población "diabética" que presenta alteración de la función hepática.

Los valores observados son la media ± SEM ($p < 0,01$)

3. ANTICUERPOS ANTIINSULINA EN DIABÉTICOS TIPO I

En un grupo de 12 pacientes insulín-dependientes con edades comprendidas entre 17 y 45 años y 3 sujetos controles, se determinaron los anticuerpos antiinsulina en suero, antes de la inyección de insulina, mediante la técnica anteriormente explicada en apartado 6.7 de material y métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.

TABLA 9 Ac. Antiinsulina en diabéticos tipo I

pacientes	n	Ac. antiinsulina
controles	3	0,26±0,1
diabéticos	12	0,48±0,2

Los valores obtenidos son la media ± SEM por duplicado.

4. ACTIVIDAD ALDOSA REDUCTASA EN HEMATÍES Y TEJIDOS

4.1 Efecto de la concentración del substrato y de proteínas sobre la actividad enzimática

Se analizó la actividad aldosa reductasa en hemolizado de hematíes de pacientes sanos a distintas diluciones (3,9 mg prot./ml de hemoliz.), con objeto de ver el efecto que ejercía la concentración de proteínas sobre la actividad del enzima.

La aldosa reductasa se midió como se indica en el apartado 6.2.1 de material y métodos. La curva obtenida se representa en la Fig.17.

En la Fig.18, se muestra el efecto de la concentración del substrato sobre la actividad aldosa reductasa. Se utilizó el gliceraldehído a concentraciones variables y el enzima se mantuvo a concentraciones constantes.

A continuación, se compara el efecto de la concentración del substrato entre pacientes diabéticos y sujetos sanos. En este caso, la reacción fué lanzada con el enzima.

Las curvas obtenidas (fig.19) alcanzan valores ligeramente superiores en la diabetes, con una V_{max} de 0,97 mU/mg proteínas para una concentración de gliceraldehído de 25 mM y una K_m de 8,5 mM; en los sujetos sanos alcanzó una K_m de 8,75 mM y una V_{max} de 0,84 mU/mg de proteínas para una concentración de gliceraldehído de 25 mM.

También, analizamos el efecto del almacenamiento del enzima a una temperatura de -18°C sobre la actividad enzimática, a concentraciones variables del gliceraldehído (Fig.20).

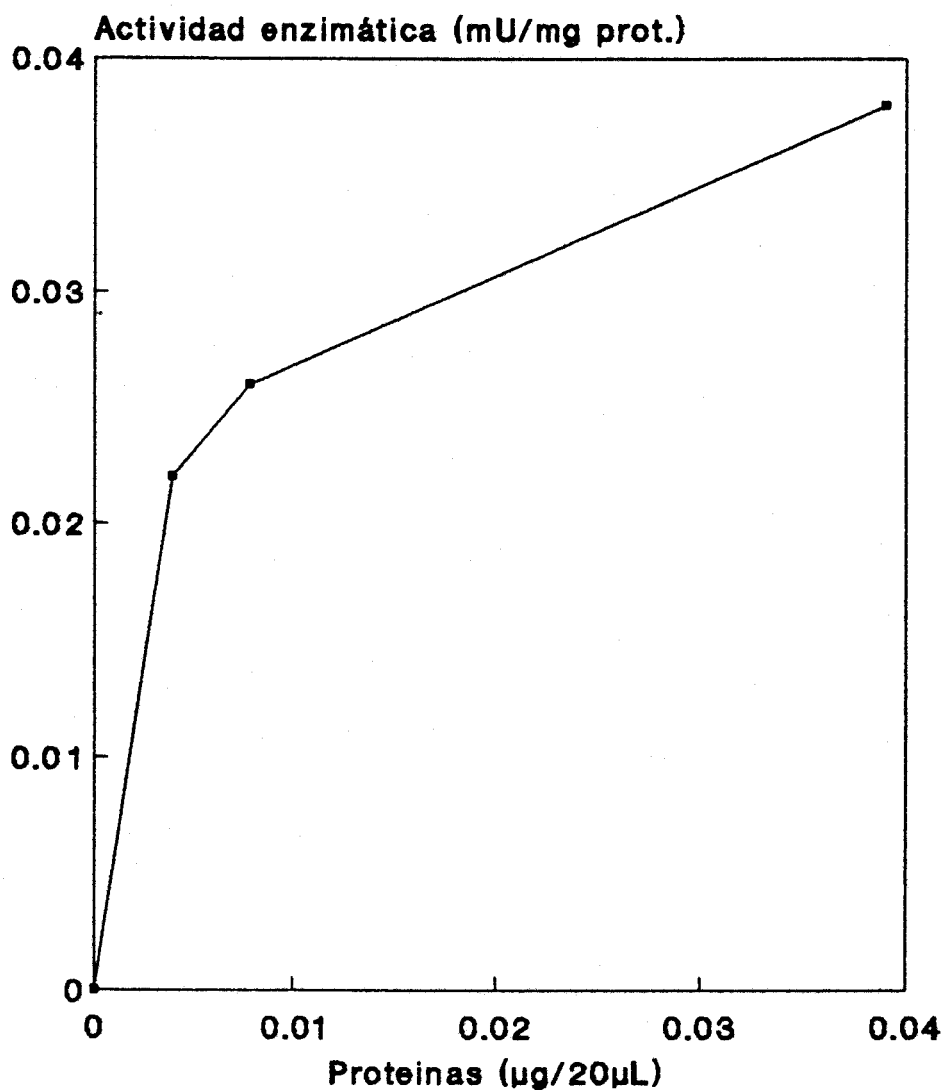


Fig.17 Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad aldosa reductasa en lisado de hematíes

La actividad aldosa reductasa se midió en un lisado de hematíes, realizado en tampón fosfato 3mM y pH 7.4, en una relación 1:20, 1:100 y 1:200 (v:v), utilizando 20 µl del hemolizado (3.9 mg prot/ml de hemol.) para el análisis del enzima en las células.

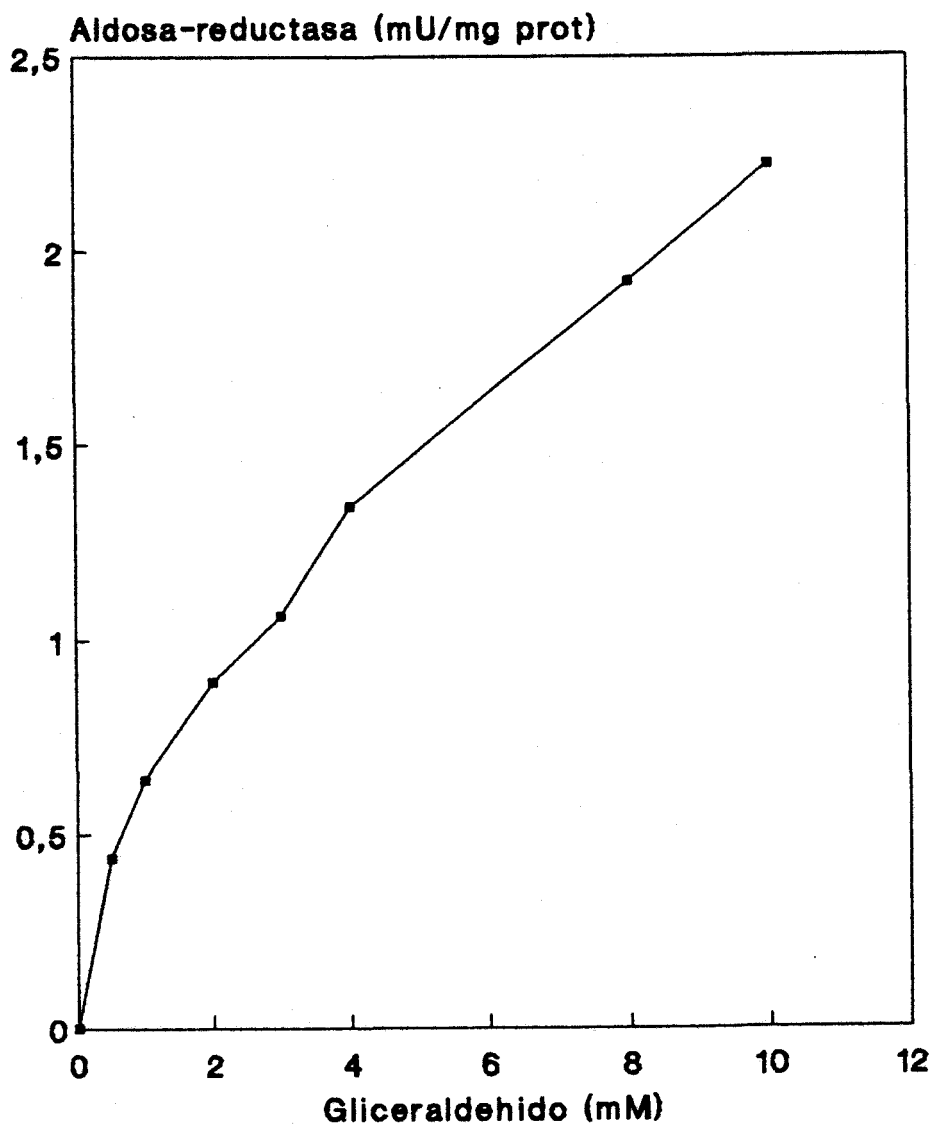


Fig.18 Efecto de la concentración del gliceraldehído sobre la actividad aldosa reductasa en lisado de hematíes

Se midió la actividad aldosa reductasa en lisado de hematíes, utilizando distintas concentraciones del sustrato. El lisado de hematíes se realizó en tampón fosfato 3mM, pH 7,4 en una relación 1:20(v:v), utilizando 20 μ l del hemolizado para el análisis de las células

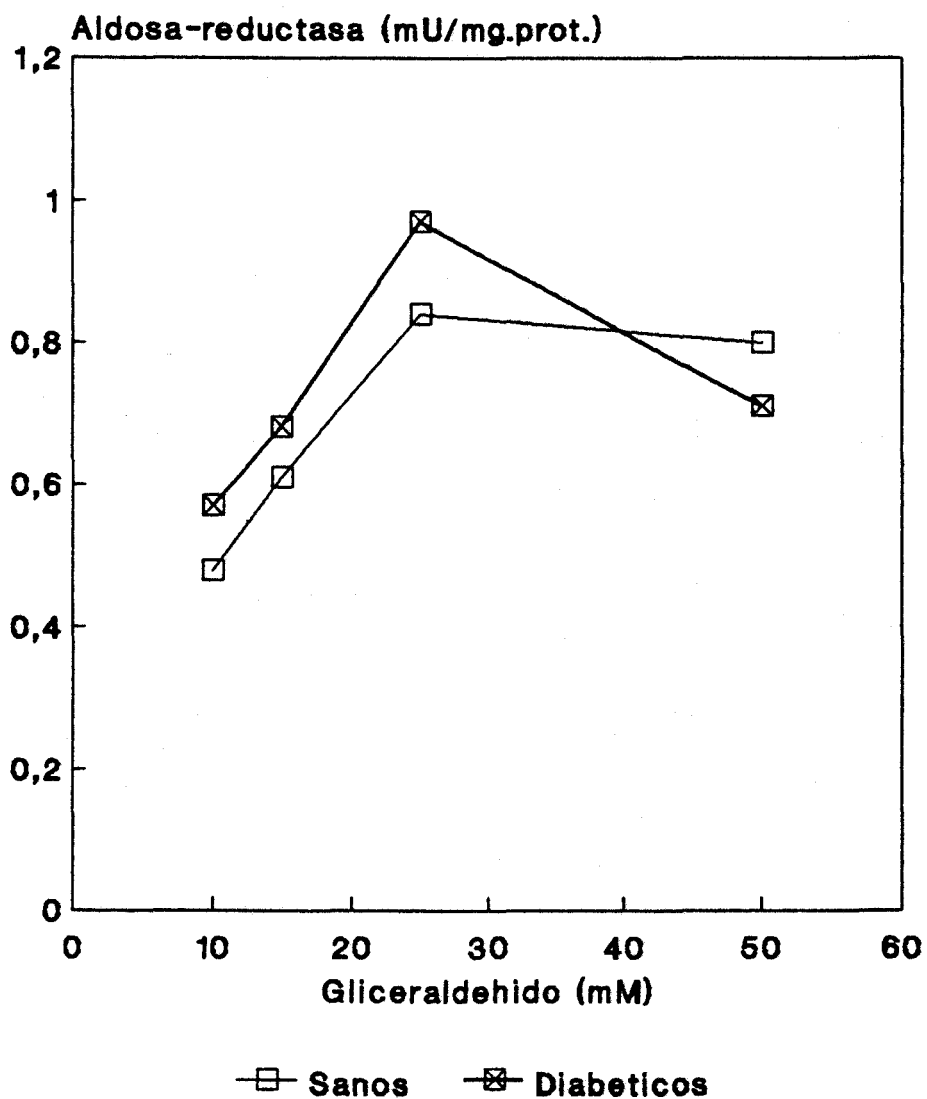


Fig.19 Efecto de la concentración de gliceraldehído sobre la actividad aldosa reductasa en lisado de hematíes de pacientes diabéticos

La actividad enzimática fué medida en lisado de hematíes de sujetos sanos (donantes) y de pacientes diabéticos. El lisado se realizó en tampón fosfato 3mM, pH 7,4 en una relación 1:20 (v:v), utilizando 20 μ l del hemolizado para la medida del enzima en las células

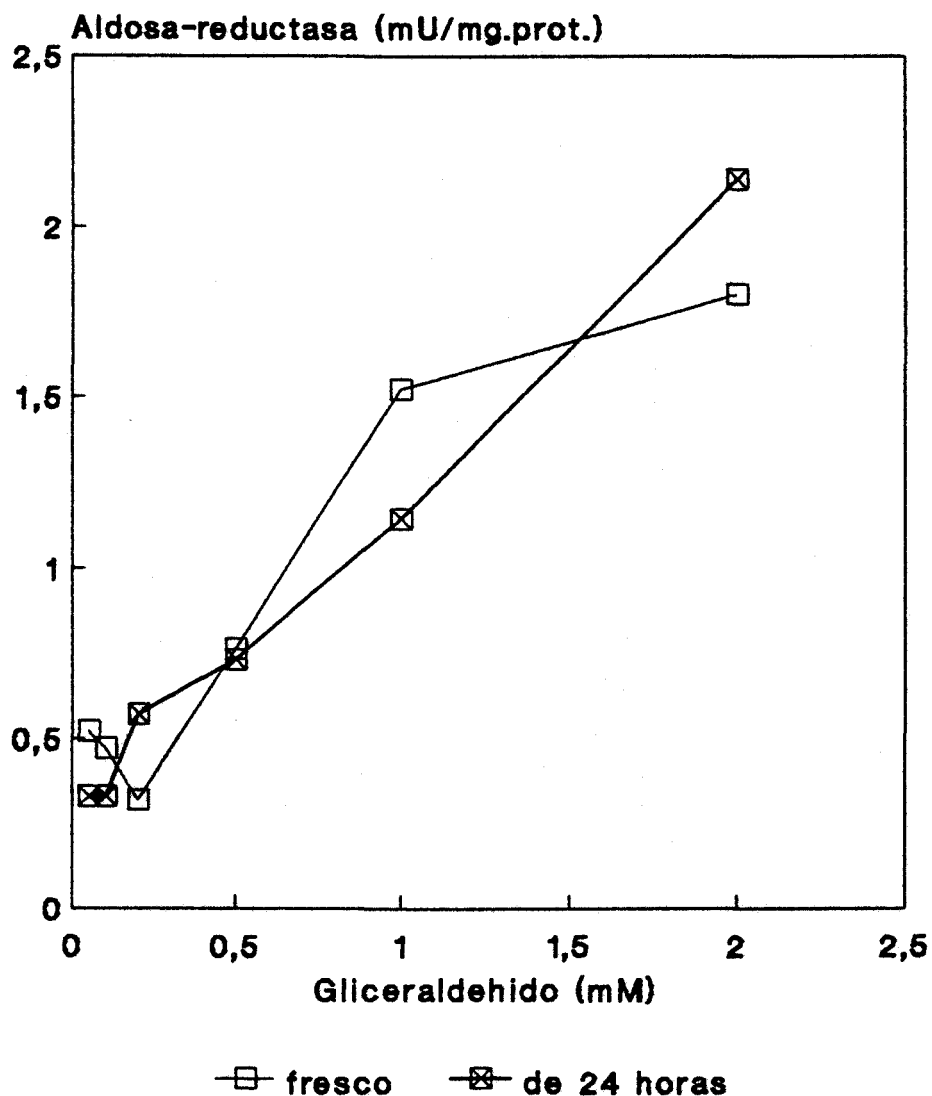


Fig.20 Efecto de la concentración de gliceraldehído sobre la actividad aldosa reductasa en lisado de hematíes

Se analizó el efecto del almacenamiento de los hematíes sobre la actividad aldosa reductasa. Los hematíes fueron lisados en tampón fosfato 3mM, pH 7,4 en una relación 1:20(v:v). Se utilizaron 20 μ l del hemolizado para el análisis del enzima en las células.

4.2 Efecto de la diabetes clínica en hematíes humanos

El estudio se realizó en 6 personas sanas (donantes) y 10 pacientes diabéticos con una duración de la diabetes entre 10 y 20 años. El objeto de este estudio fue comprobar si se producía acúmulo de este enzima en los hematíes, como indicador del aumento de la actividad de la ruta del sorbitol, implicado en el desarrollo de algunas complicaciones diabéticas.

La actividad enzimática observada en diabéticos fue escasamente mayor que en sujetos sanos. Los valores encontrados se muestran en la tabla 10.

TABLA 10 Efecto de la diabetes en la actividad aldosa reductasa en hematíes humanos

pacientes	n	Aldosa reductasa (mU/mg prot)	Glucemia (mg/dl)	Hb A1c %
sanos	6	0,41±0,03	90±0,6	4,5±0,1
diabéticos	10	0,50±0,03	180±9	6,8±0,3

La medida de la aldosa reductasa fue realizada en hemolizado de hematíes a una dilución 1:20, en tampón fosfato a pH 7,5. Los valores de la actividad enzimática y de los parámetros medidos son la media ± SEM.

4.3 Efecto de la diabetes inducida experimentalmente en hematíes de ratas

En este estudio, se utilizaron 5 ratas controles y 6 ratas diabéticas para realizar la medida de la aldosa reductasa. La inducción de la diabetes con estreptozotocina se expuso en el apartado 2 de material y método.

La actividad enzimática encontrada en ratas diabéticas fué ligeramente superior a la encontrada en ratas controles, como también ocurría en la diabetes clínica, vista anteriormente en humanos (aptdo 1.2). Los resultados se muestran en la tabla 11.

TABLA 11 Efecto de la diabetes experimental sobre la actividad aldosa reductasa en hematíes de ratas

ratas	n	Aldosa Reductasa (mU/mg prot)
controles	5	0,34 ±0,05
diabéticas	6	0,42 ±0,14

La actividad enzimática se midió en el sobrenadante de hemolizado de hematíes a una dilución 1:20 (v/v). Los valores obtenidos son la media ± SEM



4.4 Efecto del estado pre-diabético inducido sobre diferentes tejidos de ratones

El objeto de este estudio fué comprobar el estado de la actividad de este enzima antes de la manifestación clínica de la diabetes, puesto que el acúmulo de la aldosa reductasa interviene en la patogénesis de diversas complicaciones de la diabetes.

Se utilizaron 4 ratones controles y 4 ratones con pre-diabetes inducida con estreptozotocina, a dosis submáxima de 25 mg/Kg de peso durante 5 días, y fueron sacrificados 5 días después de la última dosis (ap.2.2).

La actividad aldosa reductasa se midió en homogeneizado de timo, hígado, bazo y corazón. La concentración final de gliceraldehído fué de 10 mM.

La actividad enzimática encontrada en hígado y bazo fué mayor en los ratones sanos, en timo era superior en pre-diabéticos y en corazón era prácticamente igual en ambos grupos. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 12.

De estos resultados, no podemos establecer claras diferencias entre ambas poblaciones.

TABLA 12 Actividad aldosa reductasa en tejidos de ratones pre-diabéticos.

ratones	n	timo	higado (mU/g tejido)	bazo	corazón
controles	4	5,5±3	5,1±1	4,1±0,4	2±0,1
pre- diabeticos	4	6,7±0,1	2,2±0,1	3,5±1	2,3±0,1

La actividad del enzima fué medida en homogenado de tejidos a una concentración del substrato de 10 mM y viene expresada en mU/g de tejido. Los valores son la media ± SEM.

5. ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA EN LA DIABÉTES.

Este estudio se realizó con objeto de comprobar si la acetilcolinesterasa se encontraba alterada, puesto que esta enzima parece intervenir en la patogenia de la neuropatía diabética.

5.1 Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática.

Se determinó la actividad acetilcolinesterasa en hemolizado de sujetos sanos, a concentraciones variables de la acetil-tiocolina y manteniéndose constante la del enzima.

La curva obtenida se muestra, a continuación, en la Fig.21.

5.2 Efecto del ácido β -hidroxi-butírico, in vitro, sobre la actividad enzimática en hematíes.

Se realizaron incubaciones de hematíes sanos, durante 1 h. a 37°C, con adiciones de ácido β -hidroxi-butírico 1 mM, con objeto de comprobar si este metabolito producía modificaciones en la actividad acetilcolinesterasa. El ácido β -hidroxi-butírico es uno de los cuerpos cetónicos que aparece elevado en la cetoacidosis diabética.

Como se observa en la fig.22, la actividad enzimática era de 63 \pm SEM mU/mg de prot en ausencia de adiciones y de 54 \pm SEM mU/mg prot en presencia del ácido β -hidroxi-butírico.

También, se incubaron hematíes a 0,5 y 1 mM, a tiempos variables, a 25°C. Se encontró que la actividad acetilcolinesterasa disminuía al aumentar el tiempo de incubación. Asimismo la actividad del enzima era menor cuando se adicionaba ácido β -hidroxi-butírico (fig.23).

En la fig.24, se muestra el efecto del ácido β -hidroxi-

butírico a diferentes concentraciones, sobre la actividad enzimática de hematíes sanos, en una incubación de 24h a 25°C. Como se puede observar, la actividad acetilcolinesterasa es dosis dependiente del ácido β hidroxibutírico, ya que a medida que aumenta la concentración de este cuerpo cetónico, disminuye la actividad del enzima. La actividad acetilcolinesterasa encontrada fue de 110, 100, 98 y 45 mU/mg de prot para concentraciones de 0 (sin adiciones), 0.5, 1 y 2 mM de ácido β hidroxibutírico.

5.3 Efecto de la diabetes experimental en hematíes de ratas y ratones.

Se midió la actividad acetilcolinesterasa en un grupo de 10 ratones controles y un grupo de 10 ratones diabéticos, en los que se indujo la diabetes según se explicó en material y métodos (ap. 2.2)

En los ratones diabéticos se encontró una actividad enzimática de 25 ± 5 mU/mg prot frente a 16 ± 9 mU/mg prot alcanzada en los controles (Tabla 13).

En ratas se realizó la misma medida enzimática. Se utilizaron 12 ratas controles y 12 ratas con diabetes inducida.

En la tabla 13, se observa que la actividad acetilcolinesterasa en las ratas diabéticas (29 ± 2 mU/mg prot) era mayor que en las controles ($19 \pm 0,6$ mU/mg prot), como se vió anteriormente en ratones.

TABLA 13 Efecto de la diabetes sobre la actividad acetilcolinesterasa en hematíes de ratas y ratones

Animales	Estado de los animales	n	Acetilcolinesterasa (mU/mg prot)
ratas	normales	12	19±0,6
ratas	diabeticas	12	29±2
ratones	normales	10	16±9
ratones	diabéticos	10	25±5

La medida de la actividad enzimática fué realizada en hemolizado de hematíes a una dilución 1:100 (v/v), en tampón fosfato 3 mM, a pH 7,5.

Los valores obtenidos en ratas fueron la media ± SEM de 3 experimentos realizados.

En ratones, los valores son la media ± SEM de 2 experimentos realizados.

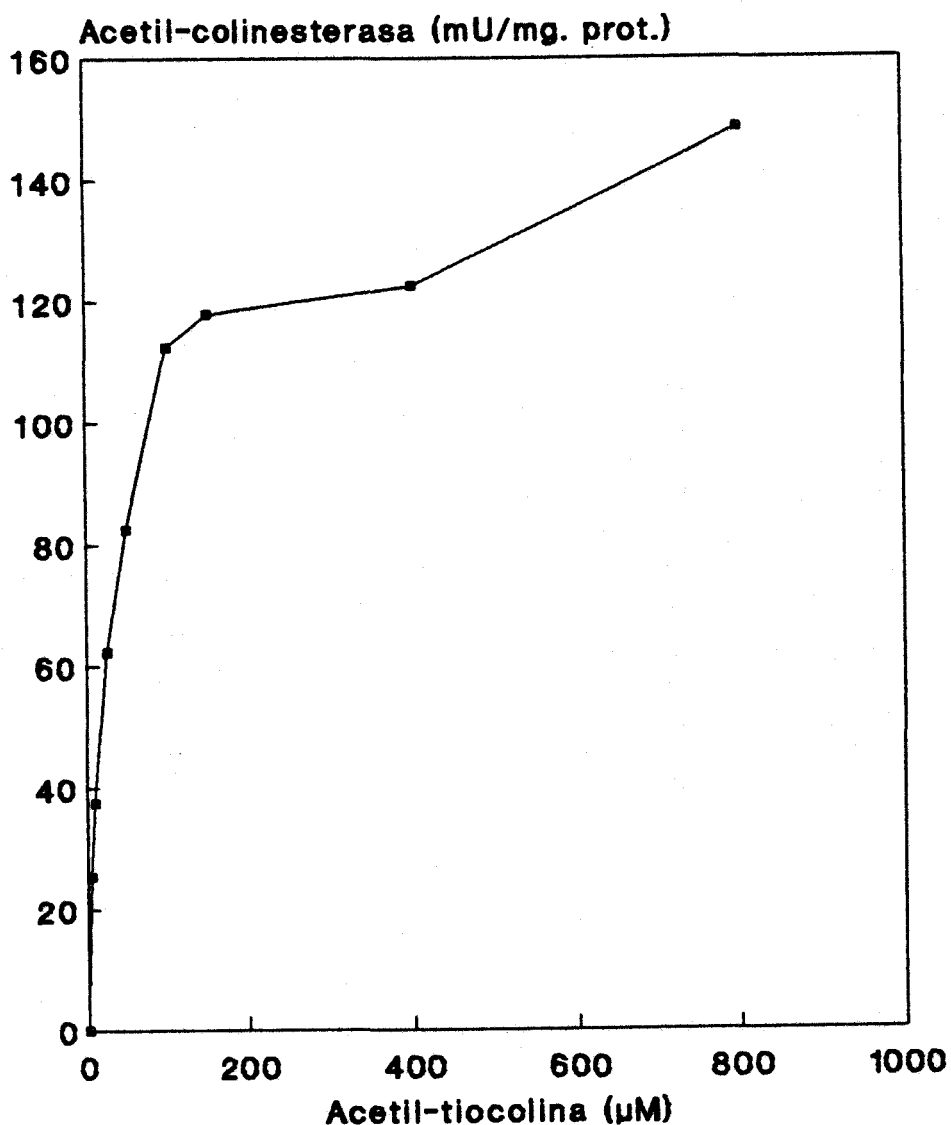


Fig.21 Efecto de la concentración de acetil-tiocolina sobre la actividad actilcolinesterasa en lisado de hematíes

Se midió la actividad enzimática en lisado de hematíes a concentraciones variables de la actil-tiocolina. Los hematíes fueron lisados en tampón fosfato 3mM, pH 7,4 en una relación 1:100(v:v). Se utilizaron 10µl del hemolizado para el análisis del enzima en las células.

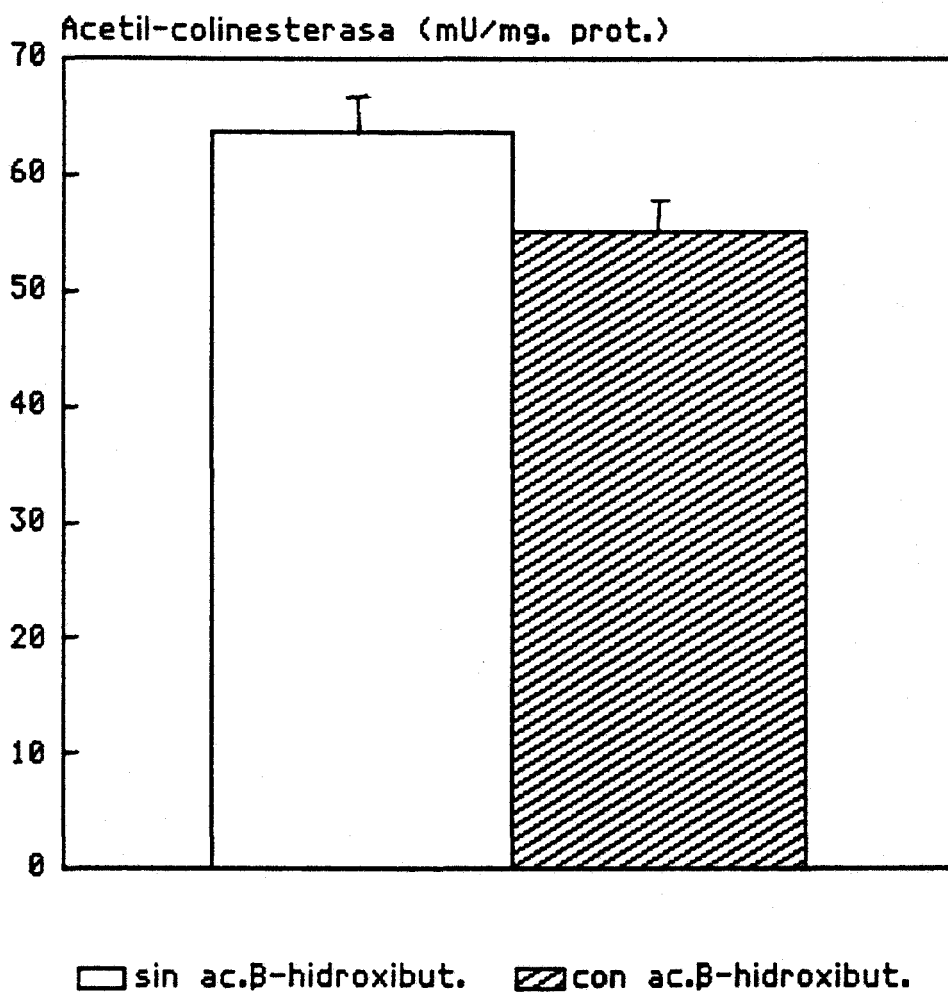


Fig.22 Efecto del ácido β hidroxi butírico sobre la actividad acetilcolinesterasa en lisado de hematíes

Se incubaron hematíes en ausencia y en presencia de ácido β hidroxi butírico a una concentración 1mM, a 37°C durante 1h. Los resultados obtenidos son la media de 3 experimentos realizados por duplicado.

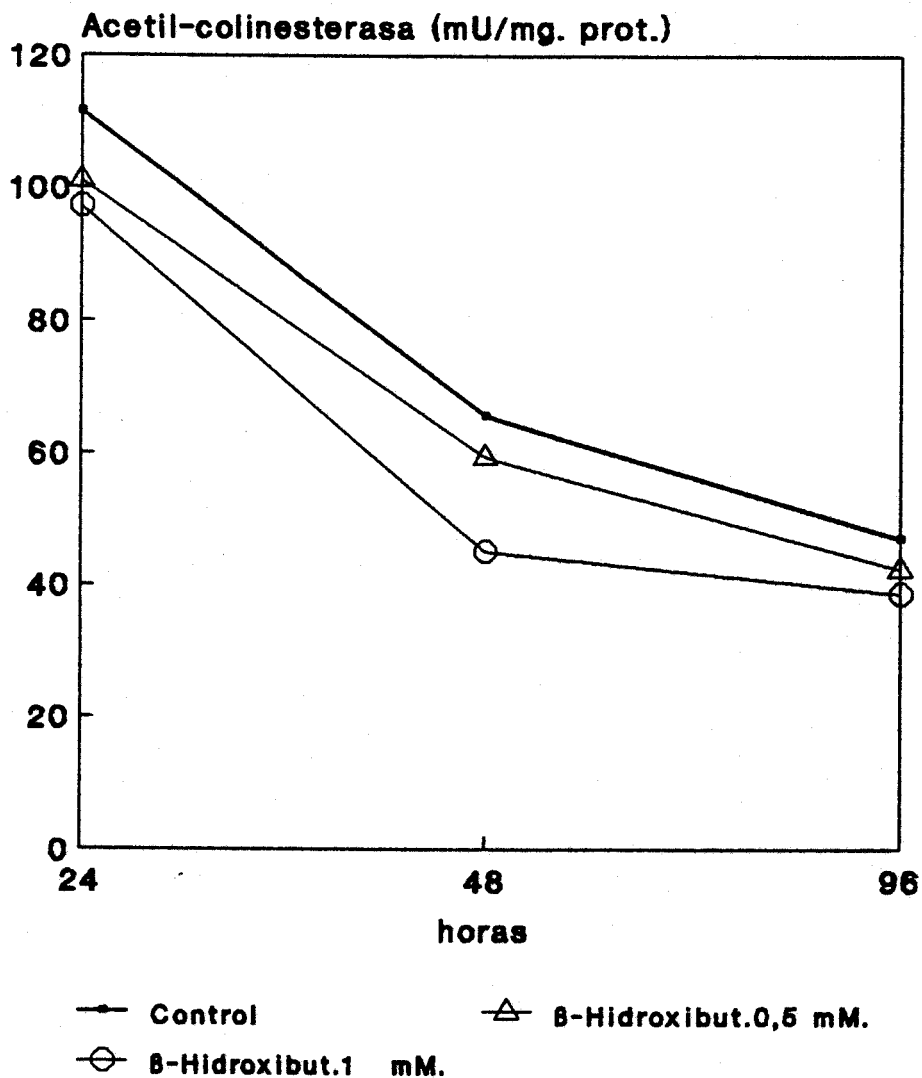


Fig.23 Efecto del ácido β hidroxibutírico sobre la actividad acetilcolinesterasa en lisado de hematíes

Los hematíes fueron incubados en ausencia y presencia de ácido β hidroxibutírico a concentraciones 0,5 y 1mM, a tiempos variables, a 25°C. Posteriormente se lisaron los hematíes en tampón fosfato 3mM, pH 7,4 en una relación 1:100(v:v) y se efectuó la medida del enzima.

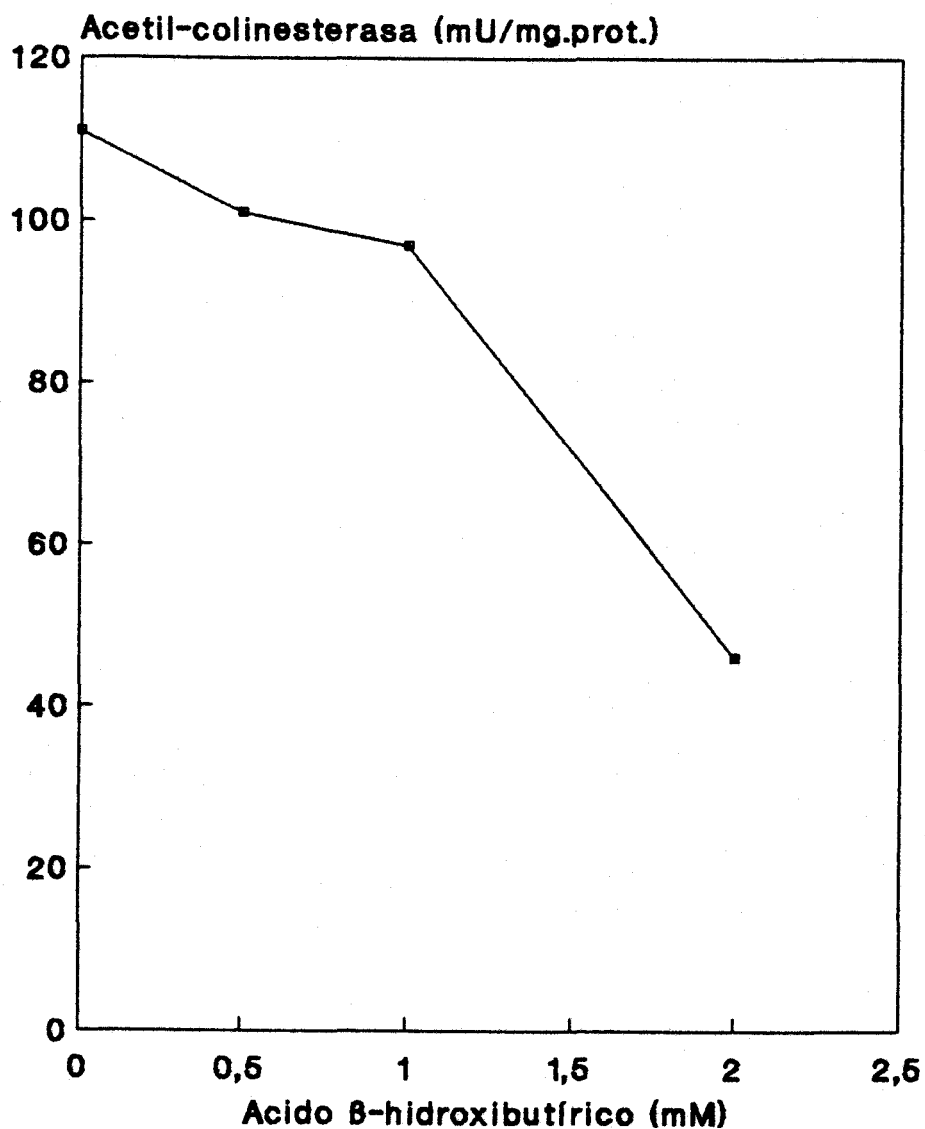


Fig.24 Efecto del ácido β hidroxí butírico sobre la actividad acetilcolinesterasa en lisado de hematíes

Se realizaron incubaciones de los hematíes en ausencia y en presencia del ácido β hidroxí butírico a concentraciones 0.5, 1 y 2 mM, a 25°C durante 24h. Posteriormente se lisaron los hematíes en tampón fosfato 3mM, pH 7,4 en una relación 1:100(v:v) y se midió la actividad del enzima en las células.

5.4 Efecto de la pre-diabetes experimental en hematíes de ratones.

Se efectuó la medida de la actividad acetilcolinesterasa en un pool de hematíes pertenecientes a un grupo control de 6 ratones y otro pool de hematíes de 6 ratones en estado pre-diabético. La fase pre-diabética se indujo como se expuso en apartado 2 de material y método.

Los resultados obtenidos, se exponen en la tabla 14 y se observa que la actividad enzimática estaba ligeramente aumentada en el grupo pre-diabético.

TABLA 14 Efecto de la pre-diabetes sobre la actividad acetilcolinesterasa en hematíes de ratones

ratones	Acetilcolinesterasa (mU/mg prot.)	glucemia (mg/dl)
controles	7,4	79
pre-diabéticos	11,2	93

La medida enzimática se realizó en un pool de hematíes pertenecientes a 6 ratones controles y un pool de hematíes pertenecientes a 6 ratones diabéticos, donde se determinaron los valores de la glucemia.

5.5 Efecto de la diabetes clínica en hematíes humanos

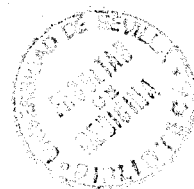
El estudio se realizó en hemolizado de hematíes de 20 personas no diabéticas y 21 diabéticos no insulín-dependientes de reciente diagnóstico y edades comprendidas entre 22-70 años.

La actividad acetilcolinesterasa encontrada en los sujetos no diabéticos fué de 81 mU/mg prot, mientras que en los diabéticos (tipo II) se observó una actividad de 85 mU/mg prot. (Tabla 15).

TABLA 15 Efecto de la diabetes sobre la actividad acetilcolinesterasa en hematíes humanos

paciente	Acetil colinesterasa (mU/mg prot)	glucemia (mg/dl)	fructosamin (μ mol/l)	Hb A _{1c} (%)	micro albuminur (mg/l)
no diabét.	81 \pm 14	90 \pm 0,5	220 \pm 8	4,8 \pm 0,1	8 \pm 3
diabét.	85 \pm 30	135 \pm 26	375 \pm 47	5,7 \pm 0,3	18 \pm 8

Los valores de la actividad enzimática y de los demás parámetros medidos son la media \pm SEM



V DISCUSIÓN

En este trabajo, examinamos diversos parámetros bioquímicos en la diabetes no insulín-dependiente humana (tipo II).

El primero de ellos fué la fructosamina, indicador de la glucemia media en un periodo de 2-3 semanas, que permite diferenciar los diabéticos con un buen control de la glucemia de los diabéticos con pobre control metabólico (39). Estudiamos este indicador en diabéticos tipo II, de reciente diagnóstico, comparandose con la glucemia basal y la hemoglobina glicosilada (Hb A_{1c}). Se observó una elevación de la concentración de fructosamina en el 35,5% de los pacientes, mientras que la Hb A_{1c} se mantuvo en el rango de normalidad en el 100% de los casos. Respecto a la glucemia basal, se encontró elevada en mayor proporción en la población diabética con altas concentraciones de fructosamina (41%) que en el grupo de diabéticos con la fructosamina en el rango fisiológico (13%).

El análisis de estos parámetros sugiere que no se puede establecer una correlación directa entre los niveles de fructosamina y los de Hb A_{1c} (41), pero sí, existe buena correlación entre glucemia y fructosamina.

Al comparar los niveles de fructosamina y Hb A_{1c}, la fructosamina parece más precisa y sensible (58) y detecta los cambios en las glucemias más precozmente que la Hb A_{1c}. Parece más útil en el seguimiento, a corto plazo, de los cambios en el control metabólico. Además de las ventajas de la simplicidad de la técnica de medida y el bajo costo (59).

Se ha descrito en la literatura, una buena correlación entre fructosamina, Hb A_{1c} y glucemia en estudios de diabéticos con un pobre control metabólico mantenido durante largos periodos de tiempo (58, 60, 61, 62). Estos resultados no están en contraposición a los expuestos en el presente estudio, puesto que, la población diabética examinada en los trabajos citados, estaba sometida a ambientes hiperglucémicos durante tiempo prolongado. Los diabéticos, objeto de nuestro estudio, eran de diagnóstico reciente; por tanto, la exposición a condiciones

de hiperglucemia mantenida fué durante periodos de tiempo más cortos, no permitiendo variaciones en los niveles de Hb A_{1c}.

La Hb A_{1c} (promedio de los valores de las glucemias en un periodo de 3 meses) sería la medida del control de la glucemia a largo plazo (63). La Hb A_{1c} y la fructosamina son expresión de diferentes periodos del control metabólico y tienen diferente significado clínico (41). Ambos parámetros no pueden ser sustituido uno por otro, sino que son complementarios, en particular en la diabetes inestable (58,64).

La fructosamina, la estudiamos en relación a las proteínas del suero. Se ha descrito que la concentración de fructosamina está linealmente relacionada con la concentración de proteínas (65), y un acelerado turnover de proteínas puede disminuir el grado de glicosilación enzimática (40). La corrección de la concentración de proteínas disminuye esta variabilidad (65).

Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron concentraciones de proteínas por debajo de los límites fisiológicos. Y comparando las dos poblaciones de diabéticos analizadas, se pudo apreciar que la concentración de proteínas se mantenía en niveles fisiológicos en ambos grupos. Los resultados mostrados sugieren que la glicosilación de las proteínas, en el presente estudio, no está influida por la concentración de proteínas plasmáticas.

Igualmente, relacionamos la fructosamina con la microalbuminuria, por la importancia de este último parámetro en la detección precoz de la nefropatía diabética (35) y la implicación del mal control de la glucemia del diabético en la aparición de esta complicación.

Observamos que el 21% de los diabéticos presentaban la microalbuminuria elevada. Estos resultados, confirman los datos mostrados por Mogensen y Parving et al. (33,34), en el que diabéticos de reciente diagnóstico muestran un significativo aumento de la microalbuminuria.

Al comparar la población diabética con la fructosamina

elevada y la población diabética con la fructosamina en el rango fisiológico, encontramos que la microalbuminuria se encontraba más elevada en el grupo de diabéticos con mayores concentraciones de fructosamina.

Esto apoya los resultados de otros autores, en los que el mal control metabólico del diabético (la fructosamina se ha considerado indicador de este control) favorece la aparición de la lesión renal (19).

La microalbuminuria, por su importancia en la detección precoz de la nefropatía diabética, también se examinó en relación a las proteínas y la albúmina del suero.

Los resultados obtenidos muestran que mayores tasas de microalbuminuria no se corresponden con mayores concentraciones de proteínas o albúmina sérica, puesto que ambos parámetros se encontraron en límites de normalidad.

También fueron examinadas las concentraciones de colesterol y triglicéridos, en relación a los niveles de fructosamina. Estos parámetros se asocian con un mayor índice de riesgos vasculares, complicaciones muy frecuentes en los diabéticos.

Detectamos, que en la población diabética con tasas elevadas de fructosamina, las concentraciones de colesterol eran ligeramente superiores con un valor medio de 250 mg/dl respecto a los diabéticos con niveles de fructosamina en rango fisiológico (220 mg/dl). Del mismo modo, se presentaron mayor número de casos con altos niveles de colesterol entre la población con fructosamina alta (65%) que entre los que presentaron niveles de fructosamina en límites de normalidad (58%).

El aumento fué más notable en los niveles de triglicéridos. Encontramos valores medios de 121 y 175 mg/dl (\pm SEM) para la población con niveles de fructosamina en rango de normalidad y para los que la presentaron por encima de este rango, respectivamente. Asimismo observamos que el 29% de la población con límites fisiológicos de fructosamina

presentó niveles altos de triglicéridos frente al 53% de pacientes con la fructosamina elevada.

Se ha descrito, que valores altos de triglicéridos pueden producir interferencias en la determinación de fructosamina (66). Sin embargo, las tasas de triglicéridos encontradas en nuestro estudio no se distanciaban excesivamente del límite fisiológico superior de este parámetro.

Los datos obtenidos sugieren, que cuando la concentración de fructosamina se encuentra elevada, indicadora de un mal control de la glucemia en la diabetes, aumentan los riesgos de padecer alteraciones de los lípidos y como consecuencia, los riesgos de complicaciones arterioscleróticas son mayores.

Otro de los parámetros medido fué la concentración de transferrina, proteína del suero que sufre glicosilación y otras modificaciones cualitativas en la diabetes (45).

El estudio lo realizamos en pacientes diabéticos tipo II sin ninguna otra patología asociada y en un grupo de diabéticos (tipo II) con alteraciones lipídicas y hepáticas.

En pacientes con diferentes formas de diabetes mellitus se han detectado cambios en el metabolismo del hierro (67). En el presente estudio, se mostraron descendidos los niveles de transferrina sérica en la población diabética. Encotrandose las concentraciones de transferrina en sujetos sanos y no diabéticos con alteraciones hepáticas y de los lípidos en 340, 350 y 330 mg/dl respectivamente. Las tasas observadas en diabéticos sin patologías asociadas, con alteraciones hepáticas y de los lipidos fueron de 295, 302 y 309 mg/dl.

Esto difiere de otras referencias de la literatura donde se encuentra elevada la concentración sérica de transferrina (46). El citado estudio se realizó en pacientes con varios años de evolución de la diabetes y afectados de retinopatía.

Según se ha descrito en otros trabajos, las proteínas humanas del suero fueron glicosiladas, in vitro, y la

glicosilación fué linealmente proporcional a la concentración de glucosa y al tiempo de incubación. La transferrina y la albúmina fueron las mayores proteínas que se glicosilaron significativamente (47). La transferrina glicosilada se encuentra elevada en la diabetes (tipo I y II) y parece ser un marcador sensible del control de la glucemia a corto plazo (8 días de vida media) (48).

Igualmente, se ha descrito que la excreción renal de transferrina en orina de 24h., es más alta en pacientes con diabetes de larga duración que en pacientes diabéticos de reciente diagnóstico y sujetos sanos. Tanto el significado pronóstico como su importancia en el diagnóstico precoz de la nefropatía diabética se encuentran en discusión (49).

En los referidos estudios, se examinó la fracción glicosilada y la excreción urinaria de transferrina, por lo que existe clara diferencia con el análisis de la transferrina que hemos mostrado.

Asimismo, examinamos los anticuerpos antiinsulina en suero de pacientes diabéticos tipo I. Estos anticuerpos se encuentran elevados en fases anteriores a la aparición de la diabetes y en diabéticos que se inyectan insulina (52).

En los experimentos realizados no se encontró aumento de estos anticuerpos en los pacientes diabéticos.

Otro de los estudios que hemos realizado hace referencia a la actividad aldosa reductasa, una de las enzimas de la ruta del sorbitol. Esta vía es una ruta menor del metabolismo de la glucosa que aumenta su actividad en los estados hiperglucémicos (68) y parece estar implicada en el desarrollo de las complicaciones diabéticas (9). Hemos analizado esta vía en hemáties (de ratas, con diabetes inducida con estreptozotocina y de pacientes diabéticos), utilizando como índice la actividad aldosa reductasa. Esta enzima transforma la glucosa en sorbitol y aumenta en el estado diabético, a consecuencia de la

hiperglucemia (8).

Se conoce que la actividad aldosa reductasa y la concentración de glucosa en plasma son determinantes de los niveles de sorbitol que se acumula en los tejidos de pacientes diabéticos. El acumulo de este poliol en los tejidos ha sido implicado en la etiología de las complicaciones diabéticas (61). Según se describe en la literatura, la aldosa reductasa exhibe significativas variaciones cualitativas y cuantitativas en gran cantidad de tejidos y especies, y su distribución permanece en controversia (69).

El propósito del presente estudio ha sido analizar el efecto que ejercía la diabetes inducida con estreptozotocina y la diabetes clínica, sobre la actividad aldosa reductasa, en hematíes. También, realizamos el análisis del efecto producido por la pre-diabetes inducida con estreptozotocina sobre la actividad de este enzima, en distintos tejidos.

Encontramos que la actividad aldosa reductasa en el estado diabético estaba aumentada con respecto al estado sano, tanto en animales de experimentación como en humanos, como ha sido descrito en repetidas ocasiones en la literatura (65).

Igualmente, examinamos la actividad aldosa reductasa en ratones, en estado pre-diabético provocado con estreptozotocina, en los siguientes tejidos: bazo, hígado, corazón y timo.

Observamos un aumento de la actividad enzimática en el timo de los ratones pre-diabéticos, pero no encontramos efecto de la fase pre-diabética sobre la actividad del enzima en los restantes tejidos.

Estos resultados sugieren, que los tejidos en los que el enzima no sufre cambios en su actividad no han padecido modificaciones de la ruta del sorbitol por efecto del estado pre-diabético, o bien el enzima no es susceptible a la estreptozotocina.

Concluimos este estudio, con el examen de la actividad acetilcolinesterasa, enzima implicada en la neuropatía diabética. El papel biológico de este enzima en la membrana del eritrocito es aún desconocido, aunque algunas de las propiedades encontradas son similares a las encontradas en la forma purificada del enzima obtenido de tejido cerebral (13).

Analizamos la actividad acetilcolinesterasa en hematíes, en estados diabético y prediabético inducidos con estreptozotocina, en ratas y ratones y en la diabetes no insulín-dependiente (tipo II) humana.

Se encontró aumento de la actividad acetilcolinesterasa en los hematíes, tanto en animales como en humanos diabéticos. Aunque el aumento en la diabetes humana era poco significativo (81 mU/mg prot en sanos y 85 mU/mg prot en diabéticos). El mismo efecto produjo la fase pre-diabética en los ratones sobre la actividad del enzima, que se encontraba aumentada con respecto a la actividad enzimática de los ratones sanos (7 y 11 mU/mg prot en sanos y pre-diabéticos, respectivamente)

Se ha descrito una disminución de la actividad acetilcolinesterasa en hematíes de pacientes diabéticos insulín-dependientes (tipo I) (13) y en nervio ciático de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina (15). La reducción del acumulo de acetilcolinesterasa es el resultado de una disminución en la cantidad de partículas que contienen acetilcolinesterasa que están en movimiento, las cuales se mueven por un flujo rápido. La actividad acetilcolinesterasa es restaurada por el tratamiento con insulina, al enlentecer el flujo de membrana, repone la normal actividad del enzima (13, 15). Sin embargo, estos trabajos se han realizado en hematíes de diabéticos tipo I no controlados y en nervio ciático de ratas con diabetes inducida experimentalmente, mientras que nuestro estudio se ha realizado en hematíes de diabéticos tipo II, de reciente diagnóstico (niveles de glucemia en ayuna >125 mg/dl) y hematíes de ratas y ratones.

También, estudiamos el efecto, *in vitro*, que produce el ácido β hidroxibutírico sobre la actividad acetilcolinesterasa en hematíes de sujetos sanos. Este metabolito es uno de los cuerpos cetónicos que aparece elevado en la cetoacidosis diabética.

Los resultados obtenidos sugieren que el ácido β hidroxibutírico actúa disminuyendo ligeramente la actividad de esta enzima, cuando se realizan incubaciones durante 1h y a concentraciones de 1 mM ($63 \pm \text{SEM}$ mU/mg prot en ausencia del metabolito y $56 \pm \text{SEM}$ mU/mg prot en presencia del mismo). Cuando el tiempo de incubación de los hematíes se prolonga (24h, 48h y 4 días) y se emplean concentraciones de ácido β hidroxibutírico de 0,5 y 1 mM, la inhibición que produce sobre la actividad del enzima, es también pequeña (Fig. 23). Sin embargo, observamos que la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa era dosis dependiente del ácido β hidroxibutírico, puesto que al aumentar la concentración de este metabolito se incrementó la inhibición del enzima (111, 100, 98 y 45 mU/mg prot para concentraciones de ácido β hidroxibutírico de 0, 0.5, 1 y 2 mM, respectivamente).

Aunque no se valoraron las concentraciones de ácido β hidroxibutírico en los pacientes diabéticos estudiados, se sabe que los niveles de este cuerpo cetónico pueden alcanzar concentraciones de 4-5 mM en suero a la semana de ayuno. En muchos aspectos las variaciones metabólicas de la diabetes son similares a las producidas por ayunos prolongados. Nuestros datos sugieren que la inhibición ejercida en la actividad acetilcolinesterasa a 2 mM de ácido β hidroxibutírico puede tener una significación fisiológica.

VI CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que lleva este trabajo son las siguientes:

1.a) La fructosamina, entendida como conjunto de proteínas séricas glicosiladas, ha sido tomado como indicador del control de la diabetes. Los límites de normalidad alcanzan el valor de $285 \mu\text{mol/l}$. Por encima de este valor se considera un estado hiperglucémico. En un estudio sobre 48 pacientes diabéticos (tipo II), detectamos que la correlación entre glucosa y fructosamina son complejas. Se encontró que existe una buena correlación entre fructosamina y glucosa en un 41% de los pacientes. Sin embargo en un 59% se observó que a una glucosa normal correspondía una fructosamina elevada. Asimismo, se encontró que solo un 13% de los pacientes con glucosa alta tenían una fructosamina normal. De ello concluimos que la fructosamina es un buen indicador del control de la diabetes, ya que incluso con valores normalizados de glucemia se observan altas tasas de fructosamina.

b) Del análisis de la fructosamina y hemoglobina glicosilada (Hb A_{1c}) (indicadora de la glucemia media en 2-3 meses) sobre la población diabética no insulín-dependiente (n=48), se observó que la hemoglobina glicosilada se encontraba dentro del rango fisiológico en el 100% de los casos, frente al 35% de pacientes que presentaron valores séricos de proteínas glicosiladas (fructosamina) por encima de los límites de normalidad. De estos resultados, deducimos que la fructosamina puede ser más sensible que la hemoglobina glicosilada para detectar los cambios en los niveles medios de glucemia, en el estudio de pacientes diabéticos (tipo II) realizado.

c) Examinamos, igualmente, las proteínas y albúmina séricas, como parámetros que pueden interferir en las medidas de fructosamina. En el presente trabajo, dichos parámetros estaban dentro del rango de normalidad, en todos los casos estudiados. Ello sugiere que los niveles encontrados de proteínas no modificaban la medición de la fructosamina.

d) La microalbuminuria, como indicador precoz de la alteración renal diabética, se encontró significativamente elevada en el 21% de los diabéticos tipo II estudiados (n=48) (el rango fisiológico alcanza valores máximos de 20 mg/L). Encontramos concentraciones altas de microalbuminuria en el 29,4% de los pacientes con tasas elevadas de fructosamina, frente al 16% de pacientes con niveles fisiológicos de fructosamina, que mostraron aumentada la excreción renal de microalbuminuria. Estos datos sugieren que existe cierta relación entre la lesión renal microscópica y el grado de control de la glucemia. Sin embargo, el problema parece más complejo, puesto que cuando la glucemia media se normaliza, también se producen excreciones altas de microalbuminuria.

e) En la población diabética tipo II estudiada (n=48), se observó que los niveles de colesterol se encontraban elevados en el 65% de los diabéticos con tasas elevadas de fructosamina y en el 58% de los que presentaban valores de fructosamina en el rango de normalidad. De este análisis concluimos que los niveles de colesterol se encuentran altos en la población diabética (tipo II), en general. La diferencia entre ambas poblaciones de diabéticos es poco notable. Por lo que es posible que intervengan otros factores en la determinación de esta alteración.

La concentración de triglicéridos en los diabéticos estudiados, se apreció que se encontraba por encima de valores fisiológicos en el 54% de los pacientes con tasas elevadas de fructosamina y en el 29% de los que mostraban este parámetro dentro de la normalidad. La diferencia encontrada entre ambos grupos de pacientes fué importante. Ello sugiere que la alteración de los triglicéridos está directamente relacionada con el grado de glicosilación de las proteínas séricas.

2. La transferrina, proteína del suero que transporta el hierro, se encontró modificada en el estado diabético. El rango fisiológico se encuentra entre 200-400 mg/dl. Se examinó una

población con diabetes no insulín-dependiente en la que no se encontraron patologías asociadas y una población en la que se presentaron alteraciones lipídicas o hepáticas, unidas a la diabetes. En todos los grupos de diabéticos, se observó un descenso en los niveles medios de transferrina (292 ± 9). En sujetos sanos y pacientes con patologías hepáticas y lipídicas sin diabetes asociada se encontró una concentración de transferrina media de 344 ± 9 . La causa de esta disminución de los niveles de transferrina no fueron objetos de nuestro estudio.

3. La aldosa reductasa se ha utilizado como índice del acumulo del sorbitol, ruta metabólica menor de la glucosa y que aumenta su actividad en los estados hiperglucémicos. El estudio se realizó en hematíes de pacientes diabéticos no insulín-dependientes y en hematíes de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. Se observó que en hematíes humanos la actividad del enzima pasaba de $0,41$ mU/mg prot. en sujetos sanos a $0,50$ mU/mg prot. en pacientes diabéticos (media \pm SEM). El mismo incremento se vió en animales, encontrándose una actividad aldosa reductasa de $0,34$ mU/mg prot. en ratas sanas y $0,42$ mU/mg prot. en ratas diabéticas (media \pm SEM).

Igualmente, se analizó esta enzima en tejidos de ratones en estado pre-diabético provocado con estreptozotocina a dosis submáxima, y se encontró que la actividad enzimática no se modificaba.

En resumen, en los estados diabéticos se produce un aumento de la actividad aldosa reductasa, pero no ocurre así en el estado pre-diabético, donde las modificaciones de la actividad de esta ruta metabólica no son apreciables.

4. La acetilcolinesterasa, enzima posiblemente implicada en la neuropatía diabética, se estudió en hematíes humanos de diabéticos no insulín-dependientes, en hematíes de ratas y ratones con diabetes inducida experimentalmente y en hematíes de ratones en estado pre-diabético provocado con

estreptozotocina a dosis submáxima.

Se observó que en la diabetes experimental la actividad del enzima en hematíes de animales sanos era de 19 mU/mg prot (ratas) y 16 mU/mg prot (ratones), mientras que en los diabéticos fué de 29 mU/mg prot (ratas) y 25 mU/mg prot (ratones) (Los valores representan la media \pm SEM).

En la fase pre-diabética se encontró que la actividad enzimática en los hematíes se incrementaba de 7,4 mU/mg prot en ratones sanos a 11 mU/mg prot en los ratones pre-diabéticos.

Igualmente, el aumento de la actividad acetilcolinesterasa encontrado en hematíes humanos con diabetes tipo II, fué poco notable. Se observó una actividad enzimática de 81 mU/mg prot. en sujetos sanos y 85 mU/mg prot. en pacientes diabéticos (media \pm SEM).

También se examinó el efecto que producía el ácido β -hidroxi butírico, in vitro, sobre la actividad de este enzima. Para el análisis se realizaron incubaciones a distintos tiempos y a concentraciones variables en hematíes de sujetos sanos. Encontramos que la actividad enzimática disminuía ligeramente en presencia de este cuerpo cetónico a una concentración de 1mM y 1h de incubación. Se advirtió una actividad enzimática de 64 mU/mg prot en ausencia del metabolito y 56 mU/mg prot en presencia del mismo (los valores son la media \pm SEM).

De igual forma, se observó que la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa era dosis-dependiente del ácido β hidroxi-butírico. Ya que, al incubar los hematíes durante 24h sin ninguna adición y con ácido β -hidroxi-butírico a 0.5, 1 y 2mM, la actividad enzimática encontrada fué de 110, 100, 98 y 45 mU/mg prot, respectivamente. Observamos que este metabolito a 2mM producía una inhibición importante sobre la actividad del enzima. Ello sugiere que el ácido β hidroxi butírico a 2mM produce una inhibición de la actividad acetilcolinesterasa que podría tener significado fisiológico.

VII BIBLIOGRAFÍA

1. Jorge J.Yunis. (1969) Chapter 1. P 1-49
2. Rapoport. (1968) Assays in Biochemistry vol.4 P 69-103
3. Greenwald I. (1925) J.Biol.Chem.63:339
4. Feig S.A., Segel G.B., Shohet S.B., Nathan D.G. (1972) J. Clin.Inv.51:1547
5. Gibson Q.H. (1948) Biochem.J. 42:13
6. Jui Wang. (1970) Acc.Chem Res 3:90
7. Shalay N, Benitez L, Ranney H. (1977) J.Clin.Inv. 36
8. S.F.Travis, A.D.Morrison, R.S.Clements, A.J.Winegrad and F.A.Oski (1970) J.Clin.Inv. vol.50:2104-2112
9. J.S.Malone, G.Knox, S.Benford and T.A.Tadesco (Nov 1980) Diabetes vol.29:861-864
10. Gonzalez,A.M., Sochor,M., Mothersan,J.S.y MacLean,P. (1986) Diabetes 35:1200-1205
11. Gonzalez,R.G., Barnett,P., Aguayo,A.J., Chen,H.M.y Chylack,L.T. (1984) Diabetes 33:196-199
12. H.Gabbay (1975) Ann.Rev.Med. 26:521-36
13. Suhail M. y Rizvi S.I. (1989) Biochem.J. 259:897-899
14. Greene,D.A., De Jesus,P.V.y Winegrad,A.I. (June,1975) J.Clin.Inv. vol.55:1326-1336
15. Schmidt,R.E., Matschinsky,F.M., Godfrey,D.A., Williams,A.D.y McDougal,D.B.,Jr. (1975) Diabetes 24,1081-1085
16. Chandramouli,V. y Carter,J.R.,Jr. (March,1975) Diabetes vol 24 n° 3 P.257-262
17. Galbraith,D.A. y Watts (1981) Biochem. J. 195,221-226

18. Mato, J.M. (1988) Avances en diabetologia 1, 54-58
19. Browlee, M. y Cerami, A. (1981) Ann.Rev.Biochem. 50:385-432
20. Winegrad, A.I. (1987) Diabetes 36, 396-406
21. D.Finegold, S.A.Lattimer, S.Nolle, M.Bernstein and D.A.Greene (Nov 1982) Diabetes vol.32:988-992
22. G.R.E.Swaniker. (1990) Biochemical clinica vol.14 n°11 pp.1158-1168
23. Clements R.S.Jr (1979) Diabetes 28:604-611
24. Brismar, T. y Sima, A.A.F. (1981) Acta Phisiol.Scand. 113, 499-506
25. Mogensen, C.E. y Anderson, M.J.F. (1975) Diabetologia 11, 221-224
26. Gabbay, K.H. y O'Sullivan, J.B. (1968) Diabetes 17, 300 Abstratc
27. Beyer-Mears A., Ku L. y Cohen M.P. (1984) Diabetes, 33:604-607
28. Goldfarb, S., Simmons, D.A. y Kern, E.F.O. (1986) Clin.Res. 34, 725
29. MacGregor, L.C. y Matschinsky, F.M. (1986) Metabolim 35 (suppl.1), 28-34
30. Bodmer, C.W., PatricK, A.W., How, T.V. y Willians, G. (Febr.1992) Diabetes 41, 209-214
31. Elving, L.D., Bakkeren, J.A.J.M., Jansen, M.J.H., De Katangelino, C.M., De Nobel, E.y Van Munster, P.J.J. (1989) Clin.Chem. 35/2, 308-310
32. Keen, H. y Chlouverakis, C. (1963) Lancet 2, 913-916
33. Mogensen, C.E. (1971) Scand.J.Clin. 28, 101-109

34. Parving, H.H., Noer, I., Deckert, T. y al. (1976) 12, 161-166
35. Viberti, G. and Keen, H. (Jul. 1984) Diabetes vol. 33: 686-692
36. Koening, R.J. y Ceramy, A. (1980) Ann. Rev. Med. 31: 29-34
37. Brownlee, M.D. (1991) Ann. Rev. Med. 42, 159-166
38. Johnson, R.N., Metcalf, P.A., Baker, J.R. (1982)
Clin. Chim. Acta 127, 87-92
39. Krause, M., Pfuller, H., Herbst, D. y Kruse, K. (Apr. 1987)
135/4, 200-203
40. Rouillet, B., Labadie, M. y Olivier, J.P. (1987) Bull Cancer
(Paris) 74/6, 635-639
41. Mosca, A., Caranini, A., Zoppi, F., Carpinelli, A., Banfi, G.,
Ceriotti, F., Bonini, P. y Pozza, G. (Jul. 1987) Clin. Chem.
33/7, 1141-1146
42. Armbruster, D.A. (Dec. 1987) Clin. Chem. 33/12, 2153-2163
43. Thorstensen, K. y Romslo, I. (1990) Biochem. J. 271, 1-10
44. Van Eijk, H.G., Van Noort, W.L., De Jong, G. y Koster, J.F.
(1987) Clin. Chim. Acta 165, 141-145
45. Pre, J. (Mar. 1989) Pathol. Biol. (Paris) 37/3, 222-235
46. Jones, A.F., Winkles, J.W., Jennings, P.E., Florkowski, C.M.,
Lunec, J. y Barnett, A.H. (Feb. 1989) Diabetes Res. 7/2, 89-92
47. Kumari, K., Bansal, V., Jagmohan, Agarwal, C.G., Rastogi, A.K.
y Sahib, M.K. (Apr-Jun 1987) Acta Diabetol. Lat. 24/2, 91-99
48. Kemp, S.F., Creech, R.H. y Horn, T.R. (Sep. 1984) J. Pediatric
105/3, 394-398
49. Kristov, V., Popova, D. y Kolebinov, N. (1987) Vutr Boles
26/3, 64-68
50. Eisenbarth, G.S. (Apr. 1988) Hospital Practice vol. 3 n°4

pp.39-47

51. Pujoll Borrell, R. (1988) Avances en diabetologia 1, 59-68
52. Atkinson, M.S. y Maclaren, N.K. (Sep.1990) Investigación y Ciencia 9, 38-46
53. Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L. y Tolbert, N.E. (1978) Anal Biochem. 87, 206-210
54. Gabbay, K.H. y Kinoshita, J.H. (1975) Wood W.A. (ed.) Methods of Enzymology vol. XLI (part B). Academic Press, New York, San Francisco, London pp. 159-165
55. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr. y Featherstone, R.M. (1961) Biochem. Pharmacol. 7, 88-95
56. Werner, W., Rey, H.-G. y Wielinger, Z. (1970) Analyt. Chem. 252, 224
57. Heidelberger, M. y Kendall, F.E. (1935) J. Exper. Med. 61, 563-591
58. Llopis, R. y Cubillo, P. (Apr.1989) Rev. Clin. Esp. 184/6, 303-304
59. De Campo, C., Monciotti, C., Grossi, F., Bertotti y Pocecco, M. (Sep-Oct.1987) 9/5, 583-584
60. Pensabeni, L. Capone, G., Gnudi, D. y Marconi, M.C., Tabacchi, P. Martelli, A.M. y Turra, F. (Sep.1987) Quad Scavo diagn. 23/3, 302-311
61. Baker, J., Cutfield, R. y Taylor, W. (Dec.1987) Med. J. 9:100 (837) pp. 733-735
62. Woo, J., Swaminathan, R., Cockran, C., Pang, C.P., Mak, Y.T., Au, S.Y. y Vallance-Owen, J. (Nov.1987) Diabetolog. 30/11, 863-868
63. Daubresse, J.C., Laurent, E., Ligny, C., Bailly, A., Lemy, C., Duchateau, A. y Meunier, J.C. (Jun.1987) Diabetes Metab. 13/3, 217-221

64. Buysschaerit, M., Ketelslegers, J.M., Mpoy, M., Galenti, C. Pirson, F., Pouthier, F. y Lambert, A.E. (Nov.1987) Diabetes Res.6/3,129-131
65. Fluckiger, R., Woodtli, T. y Berger, W. (Aug.1987) Diabetologia 30/8,648-652
66. De Schepper, J., Derde, M.-P., Goubert, P. y Gorus, F. (1988) Clin.Chem. 34/12,2444-2447
67. Andreeva, A.P., Levina, A.A., Arapova, S.D., Mazovetskii, A.G. y Tsibul'skaia, M.M. (Jan-Feb.1985) Probl.Endokrinol (MosKi) 31/1,23-25
68. Hamada, Y., Kitoh, R. y Raskin, P. (1991) Diabetes 40,1233-1240
69. Chakrabarti, S., Sima, A.A., Nakajima, T., Yagihashi, S. y Greene, D.A. (1987) Diabetologia 30,244-251

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resuelto el Trabajo de Fin de Grado de LEONOR PRIETO - CARREÑO CANDAU
en el día de la fecha, por el Tribunal Calificador de
la LEONOR PRIETO - CARREÑO CANDAU
sobre MARCADORES BIOQUÍMICOS EN LA DIABETES MELITUS


se acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE (POR
UNANIMIDAD)

Sevilla, 14 de Mayo de 1993

El Vocal,



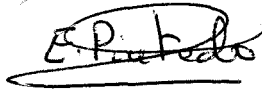
El Presidente



El Vocal,



El Secretario,



El Vocal



El Doctorado,

