

C. García<sup>1</sup>, M.T. Díaz<sup>2</sup>, F.Morales<sup>3</sup>

## Presencia de las especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus insulín dependiente

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Cuba. <sup>2</sup>Centro de Estudios para las investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto Farmacia – Alimento. Universidad de la Habana, Cuba. <sup>3</sup>Policlínico 19 de Abril. Ciudad de la Habana. Cuba.

### Correspondencia:

C. García. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Cuba.

### RESUMEN

La diabetes mellitus insulín dependiente (DMID) se manifiesta principalmente antes de los 30 años de edad.

Se ha comprobado en los últimos años la implicación que han tenido las especies reactivas de oxígeno (EROs) en la patogénesis de la diabetes mellitus (DM), debido a que destruyen las células beta pancreática, teniendo en cuenta que estas células presentan el más bajo potencial secuestrador de estas especies. Se realizó un estudio de las variables indicadoras del estrés oxidativo en una muestra de 120 sujetos distribuidos de la siguiente forma: 40 pacientes diabéticos controlados, 40 pacientes diabéticos no controlados y 40 sujetos aparentemente sanos, grupo control. Se determinaron las variables indicadoras del estrés oxidativo determinándose la actividad de las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), así como los niveles de malonildialdehído (MDA) y fructosamina.

Se observó un incremento significativo de la fructosamina y de glucosa de los pacientes diabéticos no controlados con respecto a los pacientes diabéticos controlados y, a su vez, con respecto al grupo control. Los niveles de CAT se vieron incrementados en los pacientes diabéticos no controlados, con respecto a los controlados y a los individuos sanos, ocurriendo lo mismo con los niveles de MDA. Estos resultados demuestran que en los pacientes diabéticos el exceso de EROs puede conducir a un estrés oxidativo.

**Palabras Clave:** Diabetes mellitus insulín dependiente; catalasa; superóxido dismutasa; malonildialdehído; fructosamina; especies reactivas de oxígeno.

### ABSTRACT

Diabetes mellitus type 1 (DMID) is manifested mainly before the 30 years of age.

It has been proven in the last years the implication that reactive species of oxygen (EROs) have had in the pathogenesis of diabetes mellitus (DM), because they destroy pancreatic beta cells, keeping in mind that these cells present the lowest kidnapper potential in these species. We carried out a study of the indicative variables of the oxidative stress in a population of 120 fellows distributed in the following way: 40 controlled diabetic patients, 40 patients not controlled and 40 seemingly healthy fellows as control group. The indicative variables of the oxidative stress were studied determining the activity of the enzymes: dismutase superoxide (SOD), catalase (CAT), as well as the dialdehyde malonil levels (MDA) and fructosamine.

Significant increments of fructosamine and glucose were observed in not controlled diabetic patients with regard to controlled patients and in turn with regard to the control group. The levels of CAT were not increased in the controlled diabetic patients, with regard to those controlled and to the healthy individuals, occurring the same thing with the levels of MDA. These results demonstrate that in the diabetic patients the excess of EROs can lead to an oxidative stress.

**Key Words:** dismutase superoxide; catalase; dialdehyde malonil; diabetes mellitus type 1; reactive oxygen species.

Recibido: 14 de Diciembre de 2004 / Aceptado: 31 de Marzo de 2005

Acrónimos: EROs, especies reactivas de oxígeno; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; MDA, malonildialdehído.

## INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es considerada una afectación metabólica crónica. La diabetes mellitus tipo 1 suele manifestarse en los niños y adultos jóvenes, pero puede ocurrir a cualquier edad. En los individuos con una especial predisposición genética, la destrucción inmunológica de las células productoras de insulina determina una pérdida progresiva de la insulina endógena. Por eso, se requiere insulina exógena para obtener un control de la glucemia, prevenir la cetoacidosis diabética y preservar la vida<sup>1-3</sup>.

En los últimos años se ha comprobado que las EROs participan en la destrucción de las células beta pancreáticas y, por tanto, en el desarrollo de la diabetes mellitus<sup>4,5</sup>.

La oxidación no enzimática mediada por radicales libres de moléculas biológicas, membranas y tejidos está asociada con una variedad de eventos patológicos como el cáncer y la diabetes mellitus. El estrés oxidativo ocurre fundamentalmente por un incremento de las concentraciones de radicales libres y una reducción de defensas antioxidantes, se conoce que la hiperglucemia y la hiperinsulinemia favorecen la producción de radicales libres.

Atendiendo a los antecedentes antes expuestos, constituyó objeto del presente trabajo la evaluación del estrés oxidativo en pacientes diabéticos tipo 1 con y sin control glucémico. Para ello, se determinaron los parámetros bioquímicos que permiten caracterizar el estrés oxidativo en pacientes diabéticos tipo 1 y la relación entre el grado de control glucémico y el estrés oxidativo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó de forma aleatorizada con un grupo de pacientes diabéticos controlados (n=40), pacientes diabéticos no controlados (n=40), y un grupo control (n=40), supuestamente sanos, para un total de 120 individuos incluidos, cantidad adecuada para el presente estudio.

Para la selección de los pacientes se tuvo en cuenta como criterios de inclusión los siguientes: pacientes diabéticos tipo 1 (insulino-dependiente) conocidos, mayores de 15 años de edad, independientemente del sexo, tiempo de evolución de la diabetes y del tipo de tratamiento.

Entre los criterios de exclusión estuvieron: pacientes diabéticos menores de 15 años de edad, diabéticos tipo 2 (no insulino-dependiente), diabéticos tipo 1 con complicaciones diabéticas manifiestas clínicamente.

A las muestras de suero obtenidas se les determinó la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, la concentración de MDA, fructosamina.

### Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

Este método se basa en la inhibición de la autooxidación del pirogalol por la acción de la SOD, la cual evita la reacción de propagación. Una unidad de SOD inhibe un 50% la reacción de autooxidación del pirogalol a 25°C y pH 8,2<sup>5</sup>.

El pirogalol es un compuesto que se autooxida en medio básico generando en el medio de reacción radicales superóxido, especie que es secuestrada por la SOD.

Las lecturas fueron realizadas a 420 nm, para el cálculo de la actividad enzimática se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: la densidad óptica de la muestra en condiciones normales y la correspondiente a la hidrólisis espontánea.

### Determinación enzimática de la catalasa

La enzima catalasa cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno. A través de un método espectrofotométrico se realiza el seguimiento de la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la enzima a  $\lambda = 240 \text{ nm}$ <sup>6</sup>.

Para el cálculo de la actividad enzimática se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: la densidad óptica, la cantidad de muestra, el ancho de la cubeta utilizada y el volumen total.

### Determinación de malondialdehído (MDA)

El MDA producto de la peroxidación lipídica reacciona con el ácido tiobarbitúrico para rendir un compuesto coloreado que absorbe a 535 nm. Es consecuencia de la ruptura de ácidos grasos insaturados y constituyen un índice adecuado para determinar la magnitud de las reacciones de peroxidación lipídica<sup>7</sup>.

La concentración de MDA se determinó mediante una expresión que tenía en cuenta la densidad óptica, la concentración y el coeficiente de extensión.

### Determinación del contenido relativo de fructosamina

La fructosamina, proteína del suero glicosilada, es precursora de los productos terminales de la glicosilación avanzada. Su contenido relativo se determina por la reducción que éstos originan sobre el indicador nitrobluetetrazolium (NBT), dando lugar al compuesto coloreado formazano. Esta reacción no es específica sólo para las proteínas glicosiladas; sin embargo, la reducción de compuestos como el ácido ascórbico transcurre de forma rápida (10 minutos) por lo que la cantidad de fructosamina se puede monitorizar por los cambios de absorbancia a 530 nm en los 10 minutos siguientes<sup>8</sup>.

Teniendo en cuenta todo lo antes expuesto, se realizó la determinación de los niveles de fructosamina con el objetivo de determinar el grado de control glucémico en los grupos objeto de estudio, prefiriéndose que valores superiores a 0,05 indicaban un descontrol glucémico.

El procesamiento de los datos se realizó a través del método Anova (clasificación simple) precedida de un test de homogeneidad de varianzas (Bartlett-Box). También se realizó un test de comparación múltiple (Test de Duncan) con el objetivo de detectar las diferencias significativas entre grupos. Además se empleó el test preliminar (Outliers) para detectar valores aberrantes en los datos. Con el objetivo de determinar el grado de asociación entre las variables se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r).

**TABLA I. Caracterización clínica de la muestra**

		Control n=40	Diabéticos con control glucémico n=40	Diabéticos sin control glucémico n=40
Edad	15-25	12/30%	6/15%	8/20%
	26-30	28/70%	34/85%	32/80%
Sexo	Femenino	10/25%	23/57,5%	26/65%
	Masculino	30/75%	17/42,5%	14/35%
Raza	Blanca	12/30%	20/50%	18/45%
	Mestiza	18/45%	12/30%	12/30%
	Negra	10/25%	8/20%	10/25%
Edad debut de la enfermedad (años)			22 ± 4	21 ± 3

## RESULTADOS

Para llevar a cabo los objetivos planteados, realizamos la caracterización clínica de la muestra estudiada, clasificándola en tres grupos (Tabla I): pacientes diabéticos con control glucémico, pacientes diabéticos sin control glucémico y el grupo control o individuos sanos.

En la tabla II se muestran los resultados del estudio de los indicadores del estrés oxidativo, a través del análisis de las actividades de las enzimas SOD, CAT, y los niveles de fructosamina. Además de reflejarse el estudio de los indicadores del control metabólico mediante la determinación de los niveles de fructosamina, el análisis de estos cuatro indicadores se realizó en los tres grupos caracterizados clínicamente.

## DISCUSIÓN

La muestra fue caracterizada, según la edad, mediante 2 intervalos: 15-25 y 26-30 años, observándose que en el grupo etario de 26-30 años se encontraba un 85% con control glucémico, el 80% de los pacientes diabéticos sin control glucémico y el 70% del grupo control; entre las edades de 15-25 años se observó un 15% con control glucémico, un 20% de pacientes diabéticos sin control y un 30% del grupo control. Estos datos se relacionan con lo planteado por Cameron y colaboradores, 1996, expresando que la DMID se caracteriza por un inicio habitualmente antes de los 30 años<sup>1</sup>.

En los dos grupos de diabéticos estudiados se observó el predominio del sexo femenino, ello se correlaciona con lo expresado en la Red Telemática de Salud en Cuba, Infomed, en 1998. También se aprecia una mayor representación de la raza blanca: 50% en individuos diabéticos controlados y 45% en pacientes diabéticos no controlados; estos resultados coinciden con los obtenidos por Mark y colaboradores, en 1994, que plantea que la diabetes mellitus (DM) aparece con más frecuencia en personas pertenecientes a la raza blanca<sup>15</sup>.

Es necesario señalar que en los grupos analizados en este trabajo existió similitud en cuanto al sexo, la raza y la edad.

**TABLA II. Resultados del estudio de los indicadores del estrés oxidativo y control metabólico**

	Control n=40	Diabéticos con control glucémico n=40	Diabéticos sin control glucémico n=40
Parámetros	X media ± DS	X media ± DS	X media ± DS
SOD (U/L/min)	45863,79 ± 602	24826 ± 103	36589,78 ± 258
CAT (U/L/min)	2824,2 ± 184,32	3234,2 ± 435,6	5445,3 ± 789,2
MDA (nmol/L)	26589,4 ± 58,96	28963,2 ± 12,56	57862,8 ± 32,56
Fructosamina	0,02 ± 0,009	0,03 ± 0,010	0,08 ± 0,013

DS: Desviación típica.

La edad debut de la enfermedad fue de 21 ± 3 años en los pacientes diabéticos sin control glucémico y de 22 ± 4 años en los pacientes controlados metabólicamente lo que coincide con lo planteado por Cameron, en 1996, que refleja que la diabetes mellitus tipo 1 se manifiesta antes de los 30 años de edad<sup>1</sup>.

La actividad de la enzima SOD se encontró disminuida en el grupo de diabéticos controlados y no controlados con respecto al grupo control. Esta enzima actúa como secuestradora de radicales libres, fundamentalmente el anión superóxido y como generadora de peróxido de hidrógeno, ambas pueden formar el radical hidroxilo. La SOD en el grupo de pacientes diabéticos controlados y no controlados disminuyó significativamente con respecto al grupo control; entre los dos primeros grupos se encontraron diferencias significativas, apreciándose una disminución en la actividad de la enzima de los pacientes diabéticos controlados en comparación con los pacientes diabéticos no controlados. Los resultados obtenidos se relacionan con lo planteado por Rakesh y colaboradores en un estudio realizado en ratas diabéticas donde se observó una disminución de la actividad de la enzima SOD con respecto a las ratas controles<sup>10</sup>. En 1999, Kawano y colaboradores realizaron el estudio en pacientes diabéticos, obteniendo resultados similares<sup>5</sup>.

La inhibición de la SOD puede deberse a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lo que coincide con lo reportado por Stringer y colaboradores en 1989 al plantear que el peróxido de hidrógeno en altas concentraciones forma un complejo con los iones de la enzima provocando su inhibición<sup>11</sup>.

La inhibición significativa de la SOD en los pacientes diabéticos controlados pudiera ser debido a varios eventos: elevadas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (explicado anteriormente); la disminución del radical anión superóxido (sustrato de la enzima); un recambio acelerado en la proteína, una expresión disminuida del gen o una inactivación de la propia enzima por las especies reactivas de oxígeno<sup>9</sup>.

Con el objetivo de discernir la causa de la inhibición de la SOD se realizó la determinación de la CAT (encargada de con-

vertir el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ ), observándose un incremento en la actividad de la enzima en los pacientes diabéticos controlados y no controlados con respecto al grupo control. Se manifiestan diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de diabéticos no controlados. Esto coincide con lo planteado por Rakesh y colaboradores, en 1995, los cuales demostraron que la actividad de la catalasa en ratas diabéticas está incrementada con respecto a los controles<sup>10</sup>.

Estos resultados demuestran que la actividad de la enzima en los pacientes diabéticos no controlados y controlados se debe a altas concentraciones de  $H_2O_2$  (el cual provoca una estimulación marcada de la CAT), y a la disminución de la actividad de la SOD de los pacientes con control glucémico es debido a bajas concentraciones del radical anión super-óxido, que conlleva a la formación de bajas concentraciones de  $H_2O_2$  (sustrato de la catalasa), manifestándose en una disminución en la actividad de la enzima.

También se determinaron los niveles de MDA, teniendo en cuenta los resultados anteriores y conociendo que, tanto el anión superóxido como el peróxido de hidrógeno, conllevan a la formación de otras especies, capaces de provocar daño celular y con ello peroxidación lipídica. Se apreció un incremento significativo en los pacientes diabéticos con respecto al grupo control y una disminución de la peroxidación lipídica en los pacientes diabéticos controlados con respecto a los no controlados.

Estos datos corroboran los obtenidos de la actividad de la SOD y la CAT, además demuestran que en pacientes con control glucémico existe una disminución de la peroxidación lipídica con respecto a los pacientes sin control glucémico.

Los pacientes diabéticos que presentan altos niveles de glucosa en sangre, presentan una estimulación de la CAT y aumento de MDA, lo cual coincide con lo expresado por Buechter en 1988 al plantear que las altas concentraciones de glucosa en sangre pueden provocar aumento de las EROs<sup>13</sup>.

Estos resultados también se corresponden con los obtenidos

por Rakesh y colaboradores en 1995, al determinar un incremento significativo de MDA en sangre de ratones diabéticos con respecto al control, y los obtenidos por Kakkar, en pacientes diabéticos, en 1997<sup>14</sup>.

En este trabajo se evidencia que durante la diabetes existe un incremento en las EROs, lo cual provoca efectos citotóxicos sobre los fosfolípidos de membrana, resultando la formación de MDA.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, demostramos una vez más la relación que existe entre el control de la diabetes y las EROs.

La glucosa sanguínea en altas concentraciones es capaz de unirse a los grupos amino de las proteínas de vida media prolongada, mediante una reacción de condensación y formar los productos avanzados finales de la glicosilación, los cuales también pueden formarse como consecuencia de la auto oxidación de la glucosa. Estos eventos afectan a las propiedades de las proteínas comprometiéndose las funciones propias del tejido endotelial de que forman parte. Durante esta reacción se forman EROs los cuales contribuyen a la aparición del estrés oxidativo.

Conociendo que la fructosamina es un producto de la glicosilación de proteínas y que su formación se favorece con el aumento de glucosa en plasma, realizamos la determinación de este parámetro, observándose un aumento en los pacientes diabéticos con respecto al grupo control<sup>10-11</sup>.

Esto corrobora que en los pacientes sin control glucémico existe correspondencia entre la ocurrencia de peroxidación lipídica y los niveles de glucosa en sangre.

En el presente estudio se demostró que: en los pacientes diabéticos tipo 1 controlados existe una disminución de la peroxidación lipídica con respecto a los no controlados; que el adecuado control glucémico influye positivamente en el estado oxidativo del paciente diabético; y que el tratamiento concomitante con un antioxidante sería favorable para mejorar la salud del paciente diabético.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cameron WI, Moffitt PS, Williams DR. Diabetes mellitus in the Australian aborigines of Bourke, New South Wales. *Diabetes Res Clin Pract* 1986; 2(5): 307-14.
2. Bar-Sagi D, Rotin D, Batzer A, Mandiyan V, Schlessinger J. SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* 1993; 74(1): 83-91.
3. Barrowcliffe TW. Oxygen radical, lipid peroxidation and coagulation system. *Agents Actions* 1997; 22: 347-348.
4. Domínguez C. Oxidative stress and Onset and Early Stages of type 1. Diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 1998; 21: 1736-42.
5. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(1): 146-54.
6. Chance B. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in enzymology* II. 1995: 764-75.
7. Boehringer M. Manual de técnicas y datos bioquímicos, Alemania. 1988: 350-86.
8. Buege JA. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 1978; 30: 301-10.
9. Thome J. Advanced glycation end products associated parameters in the peripheral blood of patients with Alzheimers disease. *Life Sci* 1996; 59(8): 679-85.
10. Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1995; 151: 113-9.
11. Stringer MD, Gorog PG, Freeman A, Kakkar VV. Lipid peroxides and atherosclerosis. *BMJ* 1989; 298(6669): 281-4.
12. Santini SA, et al. Defective plasma antioxidant defense and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997; 46(11): 1853-8.
13. Buechter DO. Free radicals and oxygen toxicity. *Pharm Res* 1988; 3: 253-60.
14. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci* 1997; 60(9): 667-79.
15. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331(21): 1428-36.