



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DELEGACION REGIONAL EN MICHOACÁN

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMEDICA DE MICHOACÁN.

TESIS

TITULO:

ESTRÉS OXIDATIVO, PRODUCTOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN PROTEICA Y RESISTENCIA A LA INSULINA EN FAMILIARES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS 2 Y/O HIPERTENSION ARTERIAL.

QUE PRESENTA:

DAISY YAZMÍN RODRÍGUEZ OCHOA.

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICAFARMACOBIOLOGA.

ASESOR:

DOCTORA EN FARMACOLOGÍA ANEL GOMEZ GARCÍA

MORELIA, MICHOACÁN A AGOSTO DE 2014.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento, principalmente a Dios, por haberme permitido llegar hasta aquí; a mis padres Rosa María y Roberto, que siempre participaron en la educación que hoy tengo para enfrentar la vida. Me acompañaron en mi sendero con amor y paciencia, y soy el orgulloso resultado del trabajo de ambos.

Guardo un especial agradecimiento a todos aquellos que han tocado mi vida de tantas maneras, a los que han aportado con generosidad un pedacito de su alma y su corazón contribuyendo a hacer de mi lo que soy ahora y lo que seré mañana, incluyendo aquellos que me acompañaron en las desveladas estudiando, charlando, apoyándome en todas horas.

A la Dra Anel Gomez por su paciencia y dedicación, más que nada por su comprensión y por creer en mí para sacar este proyecto.

Llego el momento, es tiempo de demostrar toda esa preparación, y llegar a ser la inspiración de muchos para seguir adelante y también a la gente que aplaudió mis éxitos.

GRACIAS!!!

DEDICATORIAS

Pido permiso para dedicar mis logros.

A la UMSNH nuestra alma mater y al instituto CIBIMI, merecen especial mención, en esta noble institución me forme y en ella he ejercido lo que se mejor: el mundo de la salud.

Me llena de satisfacción reconocer el apoyo de mi familia, la comprensión de los pacientes, el ejemplo de nuestros maestros y el entusiasmo de alumna.

Les quiero dedicar este proyecto a mis hermanos, que de alguna manera me apoyaron en todo este trayecto, a mi abuelita Virginia que fue parte importante de mi formación, y en especial a mis padres Rosa María y Roberto que jamás dejaron de creer en mí; este es el inicio de muchos proyectos más que habrán de venir y de la trayectoria que formara mi vida laboral de ahora en adelante.

Gracias Familia.

INDICE

	Pagina
I. Resumen	6
II. Abstract	7
III. Abreviaturas	8
IV. Glosario	9
V. Relación de tablas y figuras	10
VI. Introducción	11
VII. Antecedentes	13
VII.1 Diabetes Mellitus 2	13
VII.2 Obesidad	14
VII.3 Resistencia a la Insulina (RI)	18
VII.4 Estrés Oxidativo	22
VII.5 Enzima Catalasa	26
VII.6 Enzima Glutation Peroxidasa (GPx)	26
VII.7 Enzima Glutation Reductasa (GRd)	26
VII.8 Productos Avanzados de Oxidacion Proteica	32
VIII. Planteamiento del problema	38
IX. Justificación	39

INDICE		
X.	Objetivos e hipótesis	40
XI.	Material y métodos	41
XII.	Análisis estadístico	51
XIII.	Resultados	55
XIV.	Discusión	66
XV.	Conclusiones	70
XVI.	Referencias bibliográficas	71
XVII.	Relación de anexos	77

I. RESUMEN

Introducción: El estrés oxidativo es un mecanismo que contribuye a la enfermedad cardiovascular. La interacción de las Especies Reactivas de Oxígeno con las proteínas da lugar a una oxidación de los restos laterales de aminoácidos (productos avanzados de oxidación proteica, PAOP), lo cual puede traducirse en una pérdida o modificación de la función biológica que desempeñan.

Objetivo: Investigar la asociación de las enzimas de estrés oxidativo y productos avanzados de oxidación proteica con la resistencia a la insulina (RI) en individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HTA.

Material y Métodos: Estudio transversal comparativo. A 87 familiares de pacientes con DM2 y/o HTA se les realizó historia clínica completa y colectó 13 mL de sangre venosa para la cuantificación sérica de glucosa, perfil de lípidos, ácido úrico, proteínas totales (métodos enzimáticos colorimétricos); insulina, enzimas de estrés oxidativo [glutación reductasa (GRd), glutación peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD), mieloperoxidasa (MPO)] (técnica de ELISA) y los PAOP (Técnica colorimétrica). Se dividieron en 2 grupos, Grupo con RI (GRI; HOMA \geq 2.5) y Grupo sin RI (GSRI, HOMA <2.5).

Resultados: Entre los grupos en estudio fueron diferentes estadísticamente en la SOD, MPO y PAOP ($P < 0.05$). Se encontró correlación positiva en los PAOP ($r = 0.394$; $P = 0.0001$), la MPO ($r = 0.341$; $P = 0.001$) con la RI.

Conclusiones: Existe asociación del estrés oxidativo, PAOP y RI en los pacientes con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HTA con obesidad. Los pacientes con obesidad y RI tienen un mayor desequilibrio en el sistema enzimático antioxidante lo que condicionará daño en la célula beta pancreática y endotelio vascular, además tienen una mayor concentración de PAOP lo que condicionará una probable disfunción del adipocito lo que favorecerá el desarrollo de DM2 y/o HTA y a futuro las complicaciones propias de las enfermedades.

Palabras clave: estrés oxidativo, PAOPS, resistencia a la insulina.

II. ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress is an early event in the development of endothelial dysfunction. Interaction of reactive oxygen species (ROS) with proteins results in oxidation of the amino acid side residues (advanced oxidation protein products, AOPPs), which may result in loss or alteration of biological function of proteins.

Objective. To investigate the association between oxidative stress, AOPPs and insulin resistance (IR) in relatives of patients with DM2 and/or HAS.

Material and Methods: Cross-sectional study. Complete medical history, % body fat, and serum glucose, lipid profile, uric acid, total protein, insulin, enzymes oxidative stress [glutathione reductase (GRd), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO)] and, AOPPs were realized in 87 relatives of patients with DM2 and/or HAS. They were divided into 2 groups, RI Group (GRI; HOMA \geq 2.5) and group without RI (GSRI, HOMA $<$ 2.5). .

Results.. SOD, MPO and AOPP were statistically different between study groups ($P < 0.05$). PAOP ($r = 0.394$, $P = 0.0001$) and MPO ($r = 0.341$, $P = 0.001$) were correlated with RI.

Conclusions. Oxidative stress and AOPP were associated with IR in relatives of patients with DM2 and/or HAS with obesity. Patients with obesity and IR have a greater imbalance in the antioxidant enzyme system which provokes the beta cell damage and vascular endothelium. GRI has a higher concentration of AOPP what condition the greater adipocyte dysfunction thereby promoting the development of DM2 and/or HAS and the occurrence of future complications.

Key words: oxidative stress, AOPP, insulin resistance.

III. ABREVIATURAS

DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
HTA	Hipertensión arterial
PAOP	Productos Avanzados de Oxidación Proteica
RI	Resistencia a la Insulina
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HOMA	Homeostasis Model Assessment
ICC	Índice Cintura Cadera
IMC	Índice de Masa Corporal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
TAS	Presión Arterial Sistólica
TAD	Presión Arterial Diastólica
TG	Triglicéridos
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
GRd	Glutación Reductasa
MPO	Mieloperoxidasa
GPx	Glutación peroxidasa
SOD	Superóxido dismutasa
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
IRC	Insuficiencia Renal Crónica

IV. GLOSARIO

Circunferencia de cintura. Índice que mide la concentración de grasa abdominal. Se asocia con procesos de salud-enfermedad y se correlaciona estrechamente con el índice de masa corporal y la masa grasa intra-abdominal, así como también con la grasa corporal total.

Índice de masa corporal. Se calcula al dividir el peso en kilogramos sobre el cuadrado de la talla en metros (Kg/m^2).

HOMA *Homeostasis Model Assessment*, permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las células beta mediante las concentraciones de la glucosa y la insulina plasmáticas en ayunas, según la formula descrita por Mathew se calcula HOMA-IR = $[\text{insulina } (\mu\text{U}/\text{mL}) \times \text{glucosa } (\text{mmol}/\text{L})] / 22.5$.

Obesidad. Es una enfermedad crónica que se caracteriza por el almacenamiento en exceso de tejido adiposo en el organismo, se acompaña de alteraciones metabólicas y se asocia en la mayoría de los casos a patología endocrina y cardiovascular.

Resistencia a la insulina. Es la expresión de una deficiencia orgánica por lo cual los tejidos de un individuo no responden de forma normal a la acción de la hormona insulina, la cual es producida por el páncreas, siendo indispensable para que la glucosa penetre a las células de los tejidos.

V. RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

	Paginas
Tabla 1. Características de pacientes con obesidad de acuerdo a su perfil metabólico.	16
Tabla 2. Características de pacientes con obesidad de acuerdo a su perfil metabólico.	17
Cuadro 1. Concepto de Resistencia a la Insulina	20
Cuadro 2. Evolución de Resistencia a la Insulina	21
Cuadro 3. Descripción esquemática del mecanismo de producción y neutralización de EROS.	25
	34
Tabla 3. Posibles consecuencias de Estrés Oxidativo en la función proteica.	55
Tabla 4. Parámetros clínicos y antropométricos de los pacientes con obesidad.	56
Tabla 5. Parámetros bioquímicos de los pacientes con obesidad.	56
Figura 1. Productos de oxidación proteica en ambos grupos de estudio.....	57
Figura 2. Actividad de la enzima glutatión reductasa en cada uno de los grupos de estudio.....	58
Figura 3. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en cada uno de los grupos de estudio	59
Figura 4. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en cada uno de los grupos de estudio.....	60
Figura 5. Actividad de la enzima mieloperoxidasa en cada uno de los grupos de estudio	61
Figura 6. Correlación entre insulina y cintura en pacientes con obesidad	62
Figura 7. Correlación entre la RI y PAOP en pacientes con obesidad	63
Figura 8. Correlación entre la actividad de la glutatión reductasa y glucosa en pacientes con obesidad	64
Figura 9. Correlación entre la actividad de la MPO y RI en pacientes con obesidad	65

VI. INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) y la Hipertensión Arterial (HTA) son enfermedades que se asocian a un incremento en el riesgo para tener enfermedad coronaria y en la actualidad están adquiriendo el rango de pandemia en la mayoría de los países desarrollados.¹

Se conoce que los familiares de primer grado de los pacientes con DM2 presentan un riesgo elevado de desarrollar dichas patologías a lo largo de la vida.²⁻³ Existen estudios donde confirman que los familiares de pacientes con DM2 y con HTA cursan con disminución de la función de la célula beta pancreática y resistencia a la insulina (RI).⁴⁻⁵

La RI se define como la disminución de la respuesta biológica de dicha hormona sobre sus tejidos blanco,⁶ se considera uno de los factores etiopatogénicos fundamentales para el desarrollo de la DM2 y/o HTA e influye para la aparición temprana de proceso de aterosclerosis que desarrollan los pacientes cuando ya se diagnostican con DM2 y/o HTA.⁷

La relación entre RI y el proceso aterogénico es compleja por la interacción entre diversos genes predisponentes a la RI y otros que de forma independiente regulan el metabolismo lipídico y el endotelio vascular.⁸

El estrés oxidativo es un evento precoz en el desarrollo de la disfunción endotelial, uno de los mecanismos que contribuye a la enfermedad cardiovascular.⁸ El estrés oxidativo y su impacto sobre la función endotelial son reversibles, su detección temprana en las enfermedades crónicas como: obesidad, diabetes, hipertensión arterial, dislipidemias etc, podrían ser aplicables en la prevención y detección primaria para contribuir con estrategias preventivas de las mismas, pudiendo otorgar en el primer nivel de atención a todo paciente con RI medidas terapéuticas para prevenir daño endotelial y/o retardar el mismo.⁹

La mitocondria es el sitio primario de la producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y un desequilibrio en la producción de EROs trae como consecuencia la

acumulación de EROs. La función dañada de la mitocondria asociada con los niveles elevados de (EROs) se han propuesto como mecanismos que favorecen la RI.¹⁰

Las proteínas son los componentes biológicos que sufren el daño oxidativo por el ataque de radicales libres. La interacción de EROs con las proteínas da lugar a una oxidación de los restos laterales de aminoácidos, lo cual puede traducirse en una pérdida o modificación de la función biológica que desempeñan.¹¹ Mediante reacciones de agregación, entrecruzamiento y fragmentación, las proteínas atacadas por radicales dan lugar a los productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP). Witko-Sarsat y Descamps-Latscha aseguran que la determinación de PAOP constituye un marcador de valor predictivo en la IRC.¹³⁻¹⁵

VII. ANTECEDENTES

VII. 1 DIABETES MELLITUS 2

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, como consecuencia de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. La hiperglucemia crónica se asocia con daño, disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.¹⁶

La diabetes es la principal enfermedad presente en un gran porcentaje de la población en México y es un problema de salud pública prioritaria debido a su tendencia creciente y a su relación con la obesidad.¹⁶⁻¹⁸

Se sabe que una gran parte de las complicaciones asociadas a la DM se pueden prevenir; para ello es imprescindible el diagnóstico oportuno de la enfermedad, un estricto control sobre los niveles de glucemia y una alta implicación del paciente.¹⁹ La DM es un proceso crónico que es controlable y en muchos casos prevenible, de gran relevancia clínica y epidemiológica, ya que afecta a un gran número de personas, y constituye un problema personal y de salud pública de enormes proporciones.²⁰

La DM tipo 2 (DM2) se presenta en personas con grados variables de RI pero se requiere también que exista una deficiencia en la producción de insulina que puede o no ser predominante. Ambos fenómenos deben estar presentes en algún momento para que se eleve la glucemia. Aunque no existen marcadores clínicos que indiquen con precisión cuál de los dos efectos primarios predomina en cada paciente, el exceso de peso sugiere la presencia de RI. Aunque este tipo de diabetes se presenta principalmente en el adulto, actualmente su frecuencia se ha incrementado en niños y adolescentes con obesidad.²¹

VII.2 OBESIDAD

La obesidad se define como un exceso de grasa corporal debido a un desequilibrio entre la ingesta excesiva y el gasto energético. La obesidad se asocia en diferentes condiciones fisiopatológicas como la DM, HTA, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares que conllevan un alto costo económico y posee gran relevancia en salud pública.²²

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha designado a esta enfermedad como uno de los principales problemas de salud mundial no reconocidos. Se ha estimado que cerca del 7 % de la población mundial presenta un exceso de peso.²³

En México, la frecuencia de la obesidad oscila entre el 21 y 60%. Uno de los factores predisponentes de la obesidad en la actualidad, es el cambio en el estilo de vida. En 1997, la OMS reconoce que la obesidad, es una determinante principal de muchas enfermedades no transmisibles que aumenta el riesgo de varios tipos de cáncer (próstata, endometrio, mama, colón), enfermedad hepática no alcohólica, enfermedad de la vesícula biliar, afecciones músculoesqueléticas y problemas respiratorios.²³

En poblaciones con un alto grado de adiposidad el exceso de grasa corporal está altamente correlacionado con el peso corporal. Por esta razón el Índice de Masa Corporal (IMC) es una medición válida y conveniente de adiposidad. El IMC se calcula dividiendo el peso en Kilogramos sobre el cuadrado de la talla en metros (Kg/m^2).²⁴

En México, el sistema de salud cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998 para el manejo integral de la obesidad en adultos, que establece lo siguiente:

- Se determina existencia de obesidad en adultos cuando existe un IMC mayor de $27 \text{ Kg}/\text{m}^2$ y en población de talla baja un IMC mayor de $25 \text{ Kg}/\text{m}^2$ (talla baja es menor de 1.50 metros en la mujer adulta, y para el hombre, menor de 1.60 metros).
- El sobrepeso es una condición premórbida de la obesidad, caracterizada por la existencia de un IMC mayor de $25 \text{ Kg}/\text{m}^2$ y menor de $27 \text{ Kg}/\text{m}^2$, en población adulta

general. Para población adulta de talla baja, el IMC es mayor de 23 Kg/m² y menor de 25 Kg/m².

Se considera que en mujeres una circunferencia de cintura mayor de 80 y hasta 88 cm es factor de riesgo elevado para sufrir enfermedad crónica degenerativa. Si la circunferencia es mayor de 88 cm el riesgo se considera muy elevado. Para los hombres una circunferencia de cintura entre 95 a 102 cm se cataloga como riesgo elevado, y riesgo muy elevado cuando la circunferencia es mayor de 102 cm.

El aumento de la prevalencia de obesidad se ha documentado mediante encuestas periódicas que realizan las instituciones de investigación y salud del país. En 1993, la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC1993) encontró una prevalencia de obesidad en adultos de 21.5%; para el año 2000 la Encuesta Nacional de Salud (ENSA 2000) observó que 24% de los adultos en nuestro país la padecían y en el 2006 se encontró que alrededor de 30% de la población mayor de 20 años (mujeres, 34.5%, hombres 24.2 %) padece obesidad. Se identificó que el sobrepeso y la obesidad, son problemas que afectan a cerca de 70% de la población mexicana entre los 30 y 60 años. Las mujeres son mas afectadas (71.9%) que los hombres (66.7%).²⁵

“Casi todos los gordos son presuntos diabéticos, muchos acaban siéndolo. El tratar la obesidad, es pues, hacer una verdadera profilaxis antidiabética.”

Gregorio Morañon.

Veber Prediabetische Zustände

Budapest, 1926

En la literatura médica se ha descrito un subgrupo de sujetos con obesidad que parece que están protegidos o son más resistentes a la aparición de estas alteraciones metabólicas. Estos sujetos son conocidos como metabólicamente sanos pero obesos, ya que a pesar de tener un exceso de grasa corporal presentan un perfil metabólico más benigno desde el punto de vista cardiovascular caracterizado por niveles elevados de sensibilidad a la insulina, no hipertensión y perfiles favorables de lípidos, inflamación, hormonal, hepático e inmune.

Recientemente Primetau y cols (2010)²⁶ publicó una revisión de los potenciales mecanismos responsables de éste perfil protector en un grupo de sujetos obesos metabólicamente sanos ya que una mejor comprensión de estos mecanismos tiene importantes implicaciones en la toma de decisiones terapéuticas, en la caracterización de los sujetos para los estudios de investigación y en la educación médica al comprender los factores que predisponen, retardan o protegen a los individuos con obesidad de las alteraciones metabólicas.

Tabla 1 y 2. Características de los pacientes con obesidad de acuerdo a su perfil metabólico.

TIPIFICACION DE OBESOS	
OBESOS METABOLICAMENTE SANOS	OBESOS "DE ALTO RIESGO"
↓ Grasa visceral	↑ Grasa visceral
↑ IMC	↑ IMC
↑ Sensibilidad a la insulina	↓ sensibilidad a la insulina
↑ cHDL	↓ Chdl
↓ Triglicéridos	↑ Triglicéridos

IMC: índice de masa corporal; cHDL: colesterol de alta densidad

Fuente: Concepto de Resistencia a la insulina.

Dr. J. Martinez Valls.

Servicio de Endocrinología.

Hospital Clínico Universitario_____²⁷

Tabla 2. Características de los pacientes con obesidad de acuerdo a su perfil metabólico.

TIPIFICACION DE OBESOS	
PESO NORMAL PERO METABOLICAMENTE OBESOS	METABOLICAMENTE SANOS
↑ Grasa visceral	↓ Grasa visceral
↓ IMC	↓ IMC
↑ Masa grasa	↓ Masa grasa
↓ Masa magra	↑ Masa magra
↓ Sensibilidad a la insulina	↑ Sensibilidad a la insulina
↑ Triglicéridos	↓ Triglicéridos
↑ Grasa hepática	↓ Grasa hepática

IMC: índice de masa corporal; cHDL: colesterol de alta densidad

Fuente: _Concepto de Resistencia a la insulina.

Dr. J. Martinez Valls.

Servicio de Endocrinología.

Hospital Clínico Universitario_____²⁷

Familiares de pacientes con diabetes

El riesgo elevado de diabetes es significativamente mayor en personas que tienen antecedentes de diabetes en familiares de primer grado (padres, hermanos, hijos o abuelos) y también de segundo grado (tíos o sobrinos). Esto se debe a que la diabetes tiene un componente hereditario importante, por lo que se va a tener mayor predisposición. Por otro lado, también en una misma familia es habitual que se compartan estilos de vida, por lo que con frecuencia vemos familias con unos hábitos dietéticos poco saludables. Con respecto a la relación existente entre los antecedentes familiares de DM se plantea que está relacionada con antecedentes patológicos familiares de intolerancia a la glucosa y dislipidemia.²⁶

Se estima que entre el 40-70 % de la variación en los fenotipos relacionados con la obesidad es hereditario.²⁸

VII.3 RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)

La RI se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo²⁹. Actualmente se considera que la RI crónica o mantenida es la base común de numerosas enfermedades metabólicas y no metabólicas, como la DM tipo 2, la obesidad, la HTA, las dislipidemias (componentes del síndrome metabólico -SM-) y/o la enfermedad cardiovascular (ECV).³⁰

La RI se caracteriza por una respuesta defectuosa condicionando como mecanismo de compensación un incremento en la secreción de insulina. Cuando existe la presencia de RI los niveles de glucosa suben más de lo normal y con ello se incrementa con el tiempo el riesgo de padecer de DM2 y enfermedades del corazón.

Los métodos de referencia para estimar la RI son el clamp euglucémico-hiperinsulinémico y el análisis del modelo mínimo de Bergman, sin embargo, la práctica de ambas pruebas resulta costosa y no son útiles para estudios clínicos y epidemiológicos. Existen varios

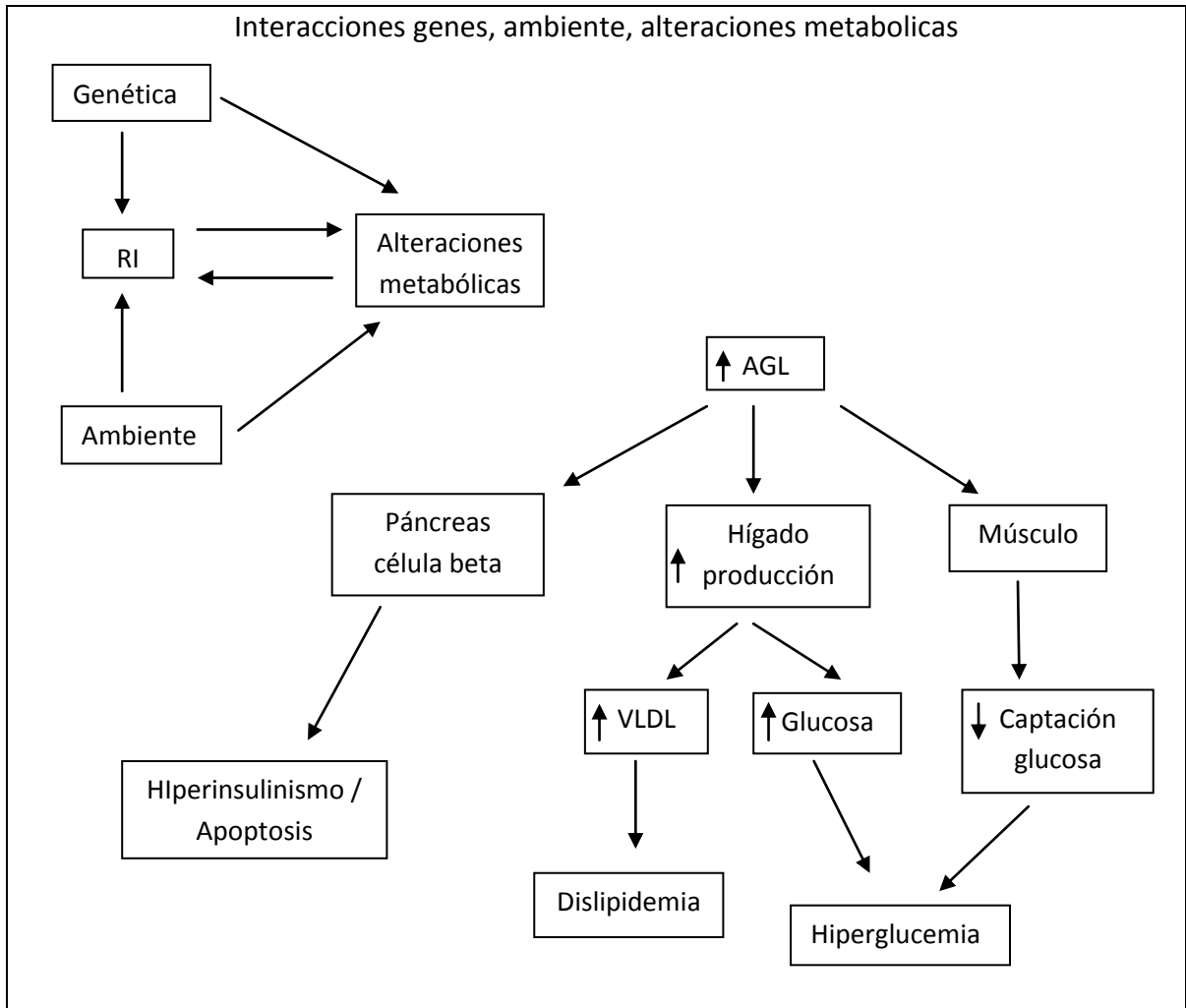
índices que se han obtenido a partir de las Pruebas de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG). Las respuestas de la glucosa y de la insulina en esta prueba reflejan la capacidad de la célula β para secretar insulina y la sensibilidad de los tejidos a la insulina. Se han validado otros parámetros resultantes de la PTOG como el área bajo la curva de glucosa (ABCG) e insulina (ABCI) que se utilizan como un índice de RI.

El índice de HOMA se basa en las cuantificaciones de glucosa e insulina en ayuno y tiene una precisión similar al “clamp” euglicémico-hiperinsulinémico validado en sujetos con varios grados de tolerancia a la glucosa.³¹

El índice de HOMA se deriva de una estimación matemática del balance entre la salida de glucosa hepática y la secreción de insulina a partir de los niveles de glucosa e insulina en ayuno³²

El modelo de HOMA requiere solo de una medición de insulina y glucosa en estado basal y se considera como una alternativa en estudios donde el recurso económico es limitado.

En el cuadro 1. Se muestra que la interacción existente entre los genes, el ambiente y algunas alteraciones metabólicas, que nos conducen a la resistencia a la insulina (RI) con una variedad de alteraciones metabólicas, entre las que se pueden encontrar el incremento en los ácidos grasos libres (AGL) que favorecen una mayor actividad de la célula beta del páncreas y nos conduce a un hiperinsulinismo. En hígado cuando hay una mayor producción de estos AGL, hay un incremento de VLDL y glucosa, ocasionando una dislipidemia e hiperglucemia respectivamente y a nivel de músculo esta sobreproducción de AGL disminuye la captación de glucosa por el músculo y nos genera una hiperglucemia circulante.



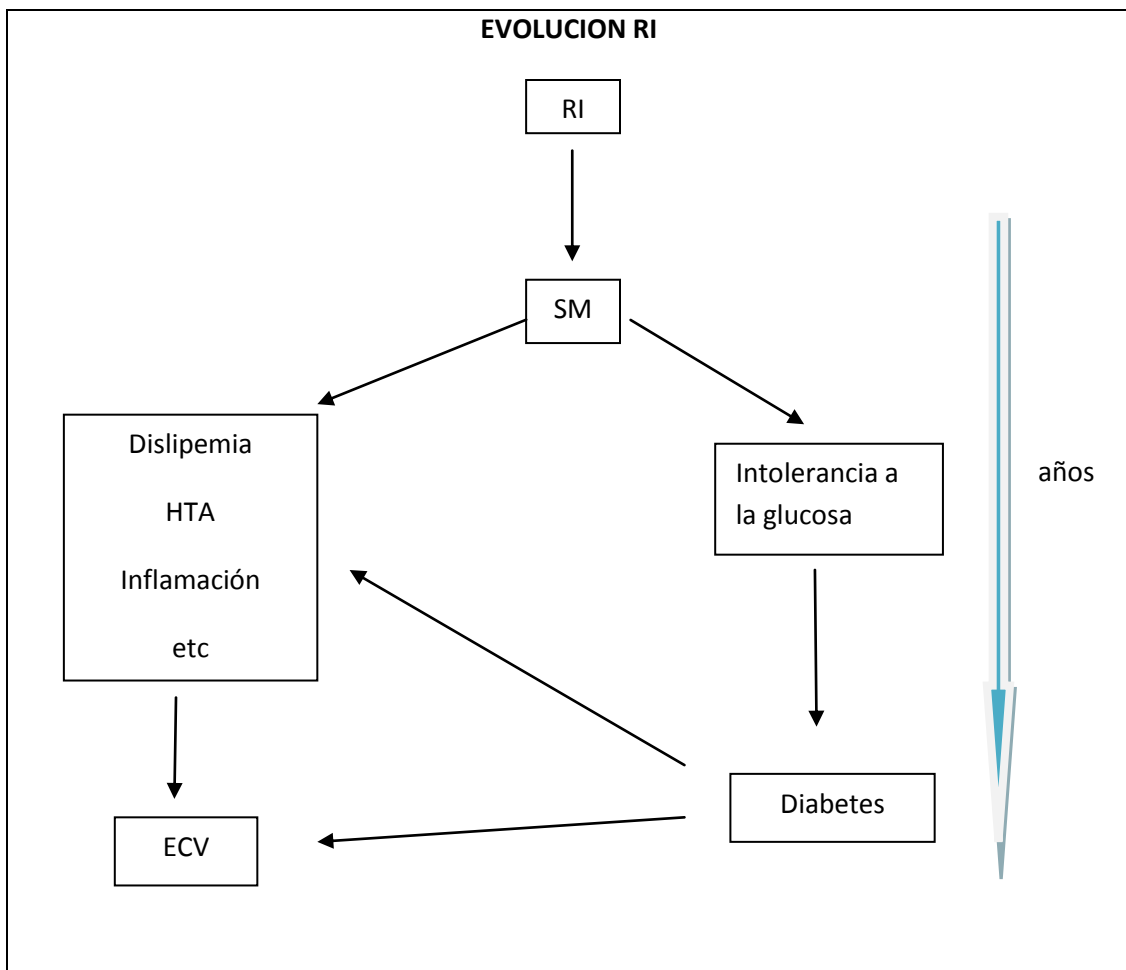
Concepto de Resistencia a la insulina

Dr J. Martinez Valls

Servicio de Endocrinología

Hospital Clínico Universitario.²⁷

En el cuadro 2. se muestra que la RI en personas jóvenes favorece la aparición del síndrome metabólico(SM), provocando una intolerancia a la glucosa, a través de los años, pudiendo llegar así a la presencia de DM2, HTA y enfermedades cardiovasculares(ECV).



Concepto de Resistencia a la Insulina

Dr. J. Martínez Valls

Servicio de Endocrinología

Hospital Clínico Universitario ²⁷

VII.4 ESTRÉS OXIDATIVO

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras. Dentro de este concepto genérico, las formas parcialmente reducidas del oxígeno se denominan Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), ya que generalmente son más reactivas que la molécula de oxígeno en su estado fundamental; el término se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y son fácilmente convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático (normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal del medio fisiológico). En mamíferos son muchos los procesos fisiológicos desencadenados por estas especies, como por ejemplo los mecanismos patógenos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores.³³

El desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la defensa antioxidante provoca el “estrés oxidativo” que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular.

El estrés oxidativo puede provenir de:

- Una deficiencia del sistema de defensa antioxidante.
- Un incremento de la formación de EROs, cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN y degradación proteica.

El aumento de varios de estos agentes oxidantes a la vez, provoca cambios biológicos de manera progresiva en el organismo, siguiendo más o menos un patrón común y la acumulación progresiva de esos cambios ocasiona la enfermedad.^{33 Y 35}

Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas y eliminadores de radicales (scavengers).

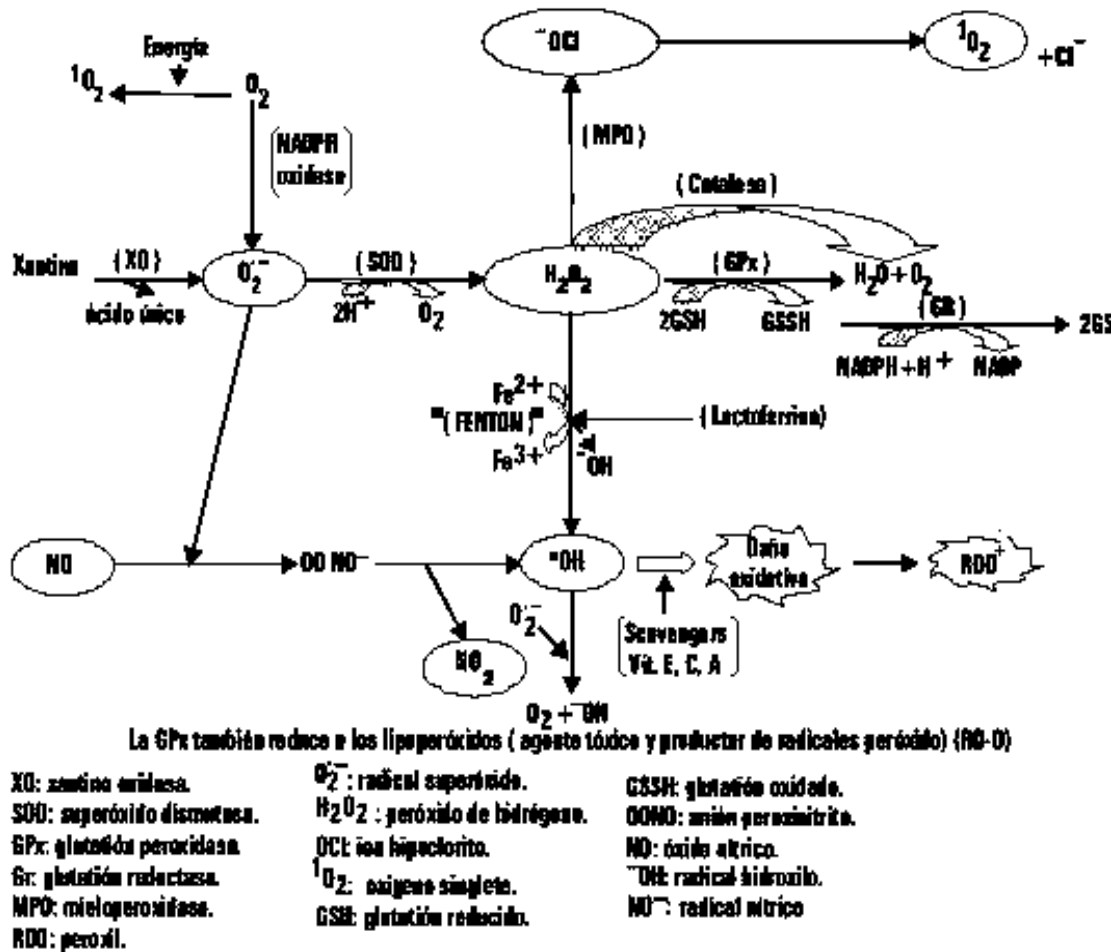


IMAGEN 1. Muestra la vía de acción de las diferentes enzimas de estrés oxidativo.

Fuente: ³³ Métodos para medir el daño oxidativo

Dr. Pedro Luis Perez Gastell

My. Jose Luis Perez de Alejo

Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Diaz Soto"

Via metabólica de las EROs

Enzimas:

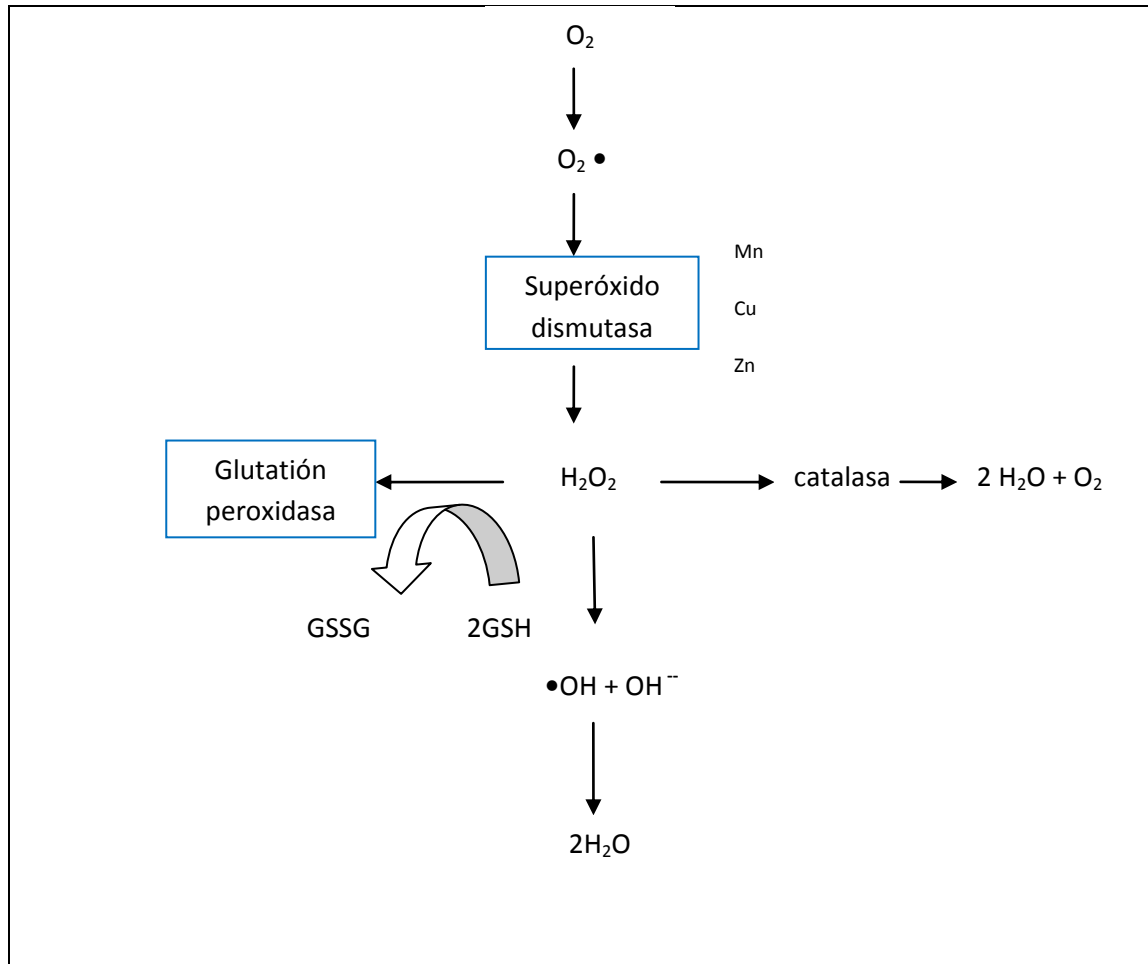
- La citocromo oxidasa está encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno
- La superóxido dismutasa (SOD) está especializada en captar el radical anión superóxido mediante una dismutación y así convertirlo en peróxido de hidrógeno.
- Catalasa y peroxidasas – glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd) – que neutralizan al H_2O_2 y lo convierten en agua.³²

Estas enzimas tienen la capacidad de desarmar a los radicales libres sin desestabilizarse. Constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo. En general, funcionan eliminando radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) antes de que interactúen para formar el radical hidroxilo OH^- . Pero existe una segunda línea de defensa compuesta por secuestradores no enzimáticos, que actúan sobre los radicales libres residuales que escapan a las enzimas antioxidantes.³³

Los antioxidantes se pueden agrupar según su naturaleza química y su modo de acción en enzimas antioxidantes (AOX), que actúan sobre EROs específicas degradándolas a moléculas menos nocivas. Los mecanismos de inactivación de las EROs incluyen etapas sucesivas.

El proceso se inicia con la dismutación del superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bajo la influencia de la Superóxido Dismutasa (SOD). La SOD es una enzima distribuida en todo el organismo. Hay dos tipos intracelulares de SOD: la que está presente en la mitocondria, que contiene manganeso en su centro activo (Mn-SOD) y la del citosol, que tiene iones de cobre y zinc (Cu-Zn-SOD). También existe la SOD extracelular.³⁴

En el cuadro 3. se muestra la descripción esquemática del mecanismo de producción y neutralización de EROs.



Cuadro 3. La secuencia de la reacción reproduce el metabolismo del oxígeno. Los cofactores para la superóxido dismutasa son el manganeso (Mn), el cobre (Cu) y el Zinc (Zn), pero nunca están presentes como una triada en la misma enzima. El cofactor para la glutación-peroxidasa es el Selenio (Se). GSH, glutación reducido; GSSG, glutación oxidado como dipeptido.

Posteriormente, Catalasa y Glutación Peroxidasa (GPx) actúa convirtiendo el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en agua.

VII.5 ENZIMA CATALASA

La catalasa es una enzima intracelular que se localiza en los glóbulos rojos. El equilibrio entre la actividad de la catalasa respecto de SOD es fundamental para mantener el balance REDOX.³⁴

VII.6 ENZIMA GLUTATION PEROXIDASA (GPx)

La GPx es un complejo enzimático. Existen cuatro formas diferentes de esta enzima y todas ellas tienen selenio en su sitio activo. La GPx elimina el (H₂O₂) formado por las SOD, transformando el glutatión reducido (GSH) en glutatión disulfuro oxidado (GSSG).

VII. 7 ENZIMA GLUTATION REDUCTASA (GRd)

La glutatión reductasa regenera el GSH a partir de GSSG, transfiriendo los equivalentes reductores del NADPH.

El glutatión (GSH) es un tripéptido distribuido ampliamente tanto en plantas como animales. El GSH sirve como un co-sustrato nucleofílico para el GSH transferasas en la detoxificación de xenobióticos y es un donante esencial de electrones a GSH peroxidasa en la reducción de hidroperóxidos.

El GSH también está implicado en el transporte de aminoácidos a través de membranas. La glutatión reductasa es una flavoproteína que cataliza la reducción dependiente de NADPH de glutatión oxidado (GSSG) a GSH. Esta enzima es esencial para el GSH redox, el ciclo que mantiene niveles adecuados de GSH celular reducido. Una proporción GSH/GSSG alta es esencial para la protección de estrés oxidativo.

PROTEINAS TOTALES

cat No. TP1630A Randox Laboratories LTD

Método de Biuret

En medio alcalino, los iones cúpricos interaccionan con los enlaces peptídicos de las proteínas formando un complejo coloreado.

ACIDO URICO

cat No. UA1611 Randox Laboratories LTD

Metodo Uricasa-PAP

METODO COLORIMETRICO.

El ácido úrico es catalizado por la uricasa y se convierte en alantoina y peróxido de hidrogeno. El peróxido de hidrogeno formado es catalizado por la peroxidasa y oxida el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico y la 4-aminofenazona para dar un compuesto de quinoneimina rojo-violeta.

PRINCIPIO

Ac. Úrico + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{uricasa}}$ alantoina + CO₂ + H₂O₂

2H₂O₂ + Ac. 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico + 4-aminofenazona $\xrightarrow{\text{peroxidasa}}$ N-(4-antipiril) -3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinoneimina

TRIGLICERIDOS

cat No. TR1695 Randox Laboratories LTD

Método GPO-PAP

METODO COLORIMETRICO

Los triglicéridos se determinan a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinoneimina formada por hidrogeno peróxido, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, bajo la influencia catalítica de peroxidasa.

PRINCIPIO

Triglicéridos + H₂O $\xrightarrow{\text{lipasa}}$ glicerol + ácidos grasos

Glicerol + ATP $\xrightarrow{\text{GK}}$ glicerol - 3-fosfato + ADP

2 H₂O₂ + 4-aminofenazona + 4 clorofenol $\xrightarrow{\text{POD}}$ quinoneimina + HCL + 4H₂O

COLESTEROL

cat No. CH198 Randox Laboratories LTD

Método CHOOD-PAP

PRINCIPIO

El colesterol se determina después de hidrólisis enzimática y oxidación. El indicador quinoneimina se forma a partir de peróxido de hidrogeno y 4-amino-antipirina en presencia de fenol y peroxidasa.

Ester de colesterol + H₂O $\xrightarrow{\text{colesterol}}$ colesterol + ácidos grasos

Colesterol + O₂ $\xrightarrow{\text{colesterol}}$ colesteno-3-ona + H₂O₂

2 H₂O₂ + fenol + 4-aminoantipirina $\xrightarrow{\text{peroxidasa}}$ quinoneimina + H₂O

COLESTEROL HDL

cat No. CH203 Randox Laboratories LTD

Método de Precipitación con Ácido Fosfotungstico.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL Y VLDL) y las fracciones de quilomicrones precipitan cuantitativamente al añadir ácido Fosfotungstico en presencia de iones de magnesio. Después de centrifugar, la concentración de colesterol se determina en la fracción de HDL (lipoproteínas de alta densidad) que queda en el sobrenadante.

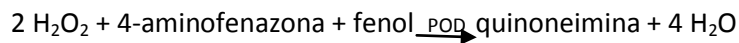
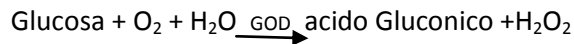
GLUCOSA

cat No.**GL2623** Randox Laboratories LTD

Método GOD-PAP

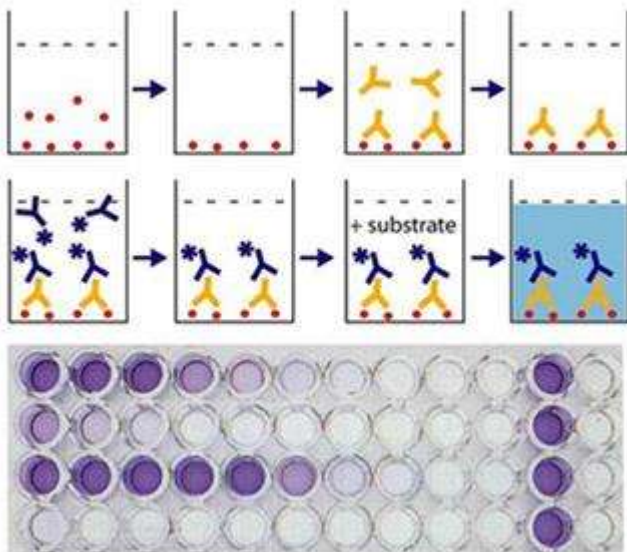
La glucosa se determina después de una oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrogeno formado reacciona, catalizado por la peroxidasa con fenol y 4-aminofenazona para formar un indicador de quinoneimina rojo-violeta.

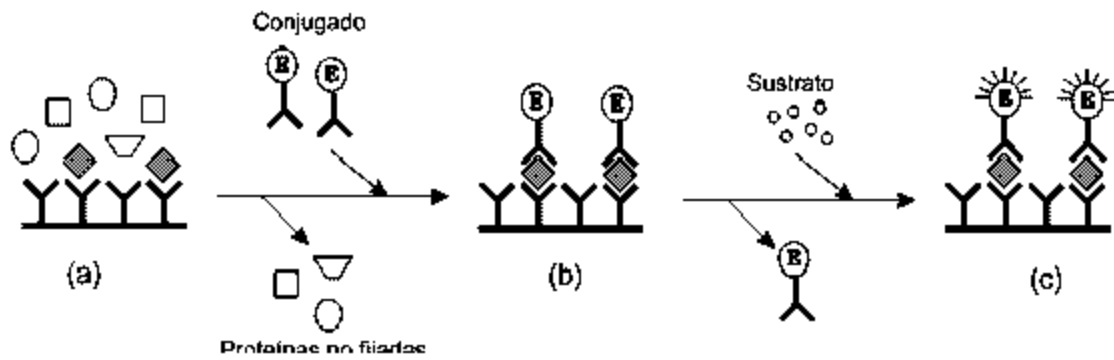
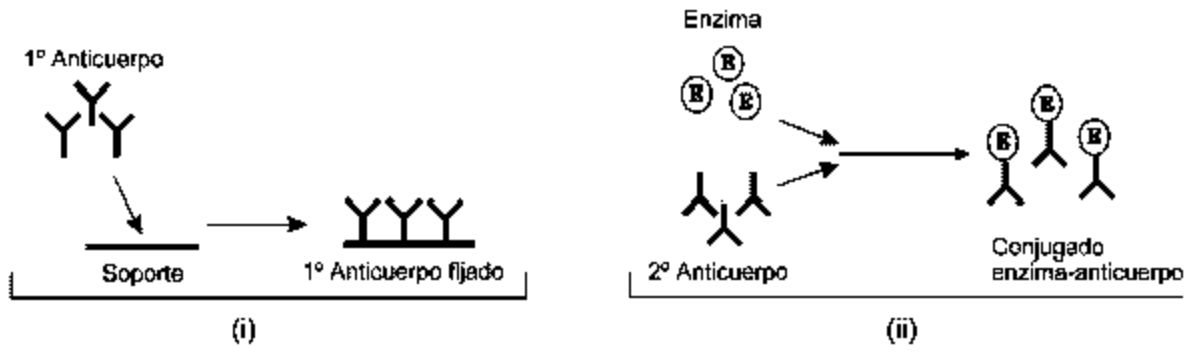
PRINCIPIO



PRINCIPIO DEL METODO DE ELISA

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedara inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.





VII.8 PRODUCTOS AVANZADOS DE OXIDACION PROTEICA.

Las proteínas son otros de los componentes biológicos que sufren el daño oxidativo por el ataque de radicales libres. La interacción de las EROs con las proteínas da lugar a una oxidación de los restos laterales de aminoácidos, lo cual puede traducirse en una pérdida o modificación de la función biológica que desempeñan.³⁵ Mediante reacciones de agregación, entrecruzamiento y fragmentación, las proteínas atacadas por radicales dan lugar a los productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP). Aunque no tan utilizado en los estudios relacionados con el estrés oxidativo como la lipoperoxidación, investigadores como Witko-Sarsat y Descamps-Latscha aseguran que constituye un marcador de valor predictivo en la insuficiencia renal crónica (IRC).³⁶⁻³⁹

Los efectos del ataque de los EROs a estas moléculas se pueden manifestar de maneras diversas resultando en dramáticos cambios en cuanto a estructura, estabilidad, función y propiedades biológicas.³⁷

Se conoce que los PAOP son elevados considerablemente en la diabetes, la acumulación de PAOP a través de los años en tejidos desempeña un papel crucial en las complicaciones diabéticas, incluso el daño del endotelio. Se sabe que los PAOPs se encontraban en concentraciones elevadas tanto en DM1 como en DM2.⁴⁰

Diversos estudios han demostrado la importancia de la oxidación de proteínas en procesos celulares como el envejecimiento y ciertas patologías, lo cual ha fomentado los estudios en el área. Posiblemente la complejidad del estudio de proteínas como blancos de oxidación haya representado un gran reto experimental. En general, cualquier factor que ocasione estrés oxidativo puede causar oxidación proteica, por ejemplo, la disminución en la eficiencia de los sistemas antioxidantes de defensa, el aumento en la producción de EROs, una disminución en la capacidad de reciclar las proteínas oxidadas o un aumento en la susceptibilidad de las proteínas para ser oxidadas^{40,41}.

Las especies reactivas de oxígeno, actuando en conjunto con metales (hierro, cobre) pueden oxidar proteínas. Esta oxidación puede ser de tipo específica o no-específica. Un

ejemplo de éstas últimas es la oxidación por radiaciones que generan un número importante de radicales libres, que difunden rápida y fácilmente dentro de la célula reaccionando con distintos grupos funcionales de las proteínas. En particular, los restos prolina, histidina, arginina, cisteína y metionina de las proteínas son particularmente sensibles al daño oxidativo. La oxidación específica ocurre en aquellas proteínas que tienen sitios de unión a metales (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}). Estos metales pueden ser reemplazados por Cu^{2+} ó Fe^{2+} , los cuales pueden generar especies reactivas de oxígeno, que atacarán a aminoácidos cercanos. La concentración intracelular de hierro también determina la producción de EROs y la carbonilación de proteínas^{42,43}.

A nivel molecular, la pérdida de electrones conlleva el cambio en el grado de oxidación de un grupo químico ya sea por reacción directa con especies reactivas de oxígeno o por reacción indirecta con productos secundarios del estrés oxidativo.

Cada EROs presenta un potencial de oxidación diferente de acuerdo a su reactividad. Por lo que nos enfocaremos al daño oxidativo en proteínas.

Las proteínas poseen diversos grupos con diferentes grados de oxidación, los cuales pueden sufrir varios grados de modificación al exponerse ante agentes oxidantes. Dependiendo de la ERO a la que se expongan las proteínas la oxidación puede ser específica (como en el caso de oxidación catalizada por un metal, que daña a las proteínas con cúmulos de hierro-azufre o con hierro libre por formación de radical hidroxilo) o inespecífica (como ocurre en la oxidación por radiación en la que se produce oxígeno en singlete).⁴⁴

La oxidación de proteínas también puede ser clasificada en reversible o irreversible como se resume en la Tabla 3. La oxidación reversible constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox, como en el caso de la formación de puentes disulfuro entre grupos tioles de cisteínas cercanas dentro de la conformación tridimensional de una proteína. Otras formas de oxidación reversible son la glutationilación y la S-nitrosilación.

La oxidación irreversible de proteínas se da por medio de cuatro mecanismos: la carbonilación, la nitración, la formación de enlaces proteína-proteína y la ruptura de enlaces peptídicos.⁴⁴

Modificación por oxidación	Tipo	Consecuencia y/o función
Carbonilación	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Nitración	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Formación de enlaces proteína-proteína	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Ruptura de enlaces peptídicos	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Glutacionilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica
S-nitrosilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica

Tomada de Referencia 44.

Tabla 3. Posibles consecuencias del estrés oxidativo en la función proteica.

La producción de EROs puede causar modificaciones químicas en proteínas. Dichas modificaciones, si son irreversibles, están normalmente asociadas con la pérdida permanente de la función y puede producir eliminación o acumulación de las proteínas dañadas. Las modificaciones reversibles normalmente se dan en cisteínas y pueden activar una función proteica o proteger al residuo de la oxidación.

Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación. Dentro de las principales modificaciones que sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a proteólisis⁴⁵. Se ha demostrado que individualmente algunos aminoácidos son más susceptibles a oxidarse que otros por lo que una proteína, dependiendo de su conformación tridimensional, puede exponer o no esos aminoácidos a la oxidación.⁴⁵

La carbonilación ocurre principalmente en los residuos prolina, arginina y lisina, pues son los residuos más susceptibles a Oxidación Catalizada por un Metal (OCM)⁴⁶. A la fecha no existe un patrón claro que indique las características estructurales que debe tener una proteína para carbonilarse preferencialmente. Anteriormente se creía que las proteínas que unen metales de transición, al ser más sensibles a OCM, deberían ser las más susceptibles a carbonilación. Sin embargo, pocas proteínas identificadas como las más carboniladas unen metales de transición, probablemente porque la coordinación a metales es diferente en cada proteína, lo cual cambia el potencial redox del metal de transición⁴⁶.

La oxidación es, en la mayoría de los casos, una modificación no reversible a nivel celular por lo que una proteína oxidada puede perder su función, en especial si las oxidaciones tomaron lugar en aminoácidos directamente involucrados con el correcto plegamiento tridimensional del péptido, o bien, si tienen papeles en las interacciones proteína-sustrato-producto, en el caso de enzimas. La pérdida de la función ya sea estructural o enzimática tiene como consecuencia un desequilibrio en el metabolismo celular. Sin embargo, no han sido descritos los procesos fisiológicos que involucran la degradación de aminoácidos provenientes de proteínas oxidadas; tal vez sean degradados como aminoácidos no oxidados, o bien dichos sistemas podrían no existir⁴⁴.

Durante las últimas décadas, se ha correlacionado positivamente el aumento de proteínas carboniladas con ciertas patologías como las que a continuación se mencionan brevemente.

Enfermedades inflamatorias. La respuesta inmunológica innata incluye la activación de neutrófilos y macrófagos que generan EROs. La intención primaria de la producción localizada de estrés oxidativo puede ser el daño exhaustivo hacia las proteínas de agentes infecciosos invasores como bacterias y parásitos. Sin embargo, la inflamación crónica aumenta la difusión de las EROs producidas y el daño al tejido circundante, produciendo estrés oxidativo en el propio hospedero y una respuesta autoinmune⁴⁷.

Diabetes. La diabetes es una de las enfermedades crónicas más comunes en todo el mundo y se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre y en etapas tardías excreción de glucosa en orina, debida a daño renal. Se han detectado altos niveles de proteínas carboniladas localizados con productos de glicoxidación y lipoxidación. El alto nivel de carbonilación de proteínas de plasma es característico de todos los pacientes diabéticos, independientemente de su edad, el avance y complicaciones de la enfermedad^{48,49}.

Daño renal crónico. En pacientes con daño renal la generación de EROs aumenta en cada sesión de diálisis debido a una deficiencia crónica de los principales sistemas antioxidantes. En estos pacientes se encuentra un aumento en la oxidación de proteínas en plasma, principalmente albúmina (carbonilación y formación de puentes disulfuro). Como consecuencia, los pacientes están expuestos a otras complicaciones como daño tisular y enfermedades cardíacas^{50,51}.

Enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad es un desorden neurodegenerativo que afecta principalmente las regiones cerebrales involucradas con el aprendizaje y la memoria. Estas regiones se reducen significativamente debido a la degeneración de

sinápsis y a la muerte neuronal. El estrés oxidativo juega un papel importante, pues el nivel de proteínas y lípidos oxidados, así como la producción de EROs aumentan en las zonas afectadas⁵²⁻⁵⁴.

Cataractogénesis. Existe un aumento dependiente de la edad del paciente en la carbonilación de las proteínas de la retina humana, lo cual predetermina la aparición de cataratas. Esta evidencia ha sido apoyada por los cambios físicos observados en el cristalino de vacas expuestas *in vitro* a sistemas de OCM, que asemejan a los ocurridos en muestras de ojos con cataratas⁵⁵

VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia de DM2 en nuestro país en adultos a nivel nacional es del 7%, y es mayor en las mujeres (7.3%) que en los hombres (6.5%). En el grupo de 50 a 59 años, dicha proporción es de 13.5%, 14.2% en mujeres y 12.7% en hombres. En el grupo de 60 a 69 años, la prevalencia es de 19.2%, 21.3% en mujeres y 16.8% en hombres.³⁷ Con respecto a la HA se reporta en la ENSA 2000 que existen 15 millones de adultos con dicha patología, siendo mayor en hombres (32.6%) que en mujeres (29.0%).³⁸

Casi una cuarta parte de los individuos tienen DM2 sin diagnosticar y un 40% de la población acude al módulo de Medicina preventiva de nuestra Institución para la detección de ésta patología.³⁹

Se conoce que los familiares de primer grado de los pacientes con DM2 y/o HA presentan un riesgo elevado de desarrollar DM2 y/o HA y como consecuencia enfermedad cardiovascular. El riesgo de muerte por un acontecimiento cardiovascular en los pacientes con DM2 y/o HA es de 2 a 4 veces mayor que en la población sin DM2.³⁷

Por lo que con base a la asociación entre algunas enzimas de estrés oxidativo y resistencia a la insulina, podrían servir para identificar individuos con un riesgo para adquirir en un futuro DM2 como son los familiares de pacientes con DM2.

Al poder identificar en este tipo de pacientes el riesgo de tener a futuro DM2, se podrá hacer conciencia en la población para establecer más estrictamente cambios en el estilo de vida o intervenir de manera farmacológica con algún medicamento de forma temprana para modificar la lesión endotelial por RI y disminución en la actividad de PAOPs.

Por lo que la pregunta a investigar es:

¿Existe asociación entre la concentración de algunas enzimas de estrés oxidativo y la RI en individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HA?

IX. JUSTIFICACION

Los familiares de pacientes con DM2 y/o HA cursan en etapas tempranas con hiperinsulinemia,⁴ y es un factor de riesgo para el desarrollo de desórdenes que incluyen hipertensión arterial, enfermedad coronaria, dislipidemias y DM2 que son enfermedades prioritarias de nuestro sistema de salud.

En el laboratorio del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del IMSS en Morelia, Michoacán, se cuantificaron las enzimas de estrés oxidativo y se implementó la técnica para cuantificar la concentración de PAOPs para así poder establecer una posible relación con la RI en familiares de pacientes con DM2 O HTA..

El beneficio de este estudio fue cuantificar las enzimas de estrés oxidativo y determinar la relación con los PAOPs en etapas tempranas adicional al inicio de alteraciones en el metabolismo de la insulina y glucosa que podrían en un futuro lesionar la pared vascular y desarrollar a futuro enfermedad cardiovascular.

X. OBJETIVO GENERAL

Investigar la asociación de las enzimas de estrés oxidativo y de PAOP con resistencia a la insulina en individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HA.

OBJETIVO ESPECIFICO

- Establecer si la concentración de PAOP se asocia con triglicéridos séricos en individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HA.

HIPOTESIS

El estrés oxidativo y productos avanzados de oxidación proteica se asocian con resistencia a la insulina en individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HA.

XI. MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio: Transversal comparativo.

Población: Individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HA de la Unidad de Medicina Familiar N° 80 del IMSS en Morelia, Michoacán

Tamaño de Muestra:

Se calculó el tamaño de la muestra con base a la ecuación de estimación de diferencia de proporciones (tamaño de muestra para cada grupo).

Se estimó que el 85% de los individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 cursan con RI y 15 % de los mismos no tiene RI.

El tamaño de la muestra para cada grupo será de:

$$n = \frac{P_1(100-P_1) + P_2(100-P_2)}{e^2}$$

Donde:

P_1 = Proporción de individuos con antecedentes heredofamiliares con RI. (85%)

P_2 = Proporción de individuos con antecedentes heredofamiliares sin RI. (15%)

e = Error estándar (8%)

SUSTITUYENDO.

$$85 (100-85) + 15 (100-15) \quad 85(15) + 15 (85)$$

$$n = \frac{\dots}{(8)^2} = \frac{\dots}{(8)^2}$$

2550

$$n = \frac{\dots}{64} = 39.8 = \mathbf{40 \text{ individuos por grupo}}$$

64

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

INCLUSION:

- Individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o Hipertensión Arterial.
- Edad entre 20 y 60 años
- Con IMC > de 25 kg/m²
- Que no estén ingiriendo algún medicamento que modifique las concentraciones de glucosa o de insulina.
- Sin modificaciones en el peso corporal al menos 3 meses previos al ingreso del estudio.

NO INCLUSION:

- Pacientes con diagnóstico previo de DM2 o HTA.
- Que no deseen participar en el estudio.

VARIABLES DEPENDIENTES: Estrés oxidativo, PAOP.

VARIABLES INDEPENDIENTES: Resistencia a la insulina.

VARIABLES BIOQUIMICAS: Glucosa, colesterol total, triglicéridos, c-HDL, c-LDL, c- VLDL, insulina, ácido úrico, proteínas totales.

METODOLOGIA

A cada paciente que reunió los criterios de inclusión y firmaron la carta de consentimiento informado por escrito (anexo 1), se les dio cita en el aula de la UMF N° 80 del IMSS en Morelia, Michoacán para:

- Un interrogatorio dirigido investigando antecedentes de diabetes, hipertensión (Historia clínica completa). (ANEXO 2)
- Se les midió la presión arterial con baumanómetro de mercurio previamente calibrado, sentado en reposo por lo menos cinco minutos, sin haber ingerido bebidas cafeinadas, no haber fumado en los treinta minutos previos al estudio.
- Se les realizó la medición del peso corporal (Kg) en báscula con estadímetro con bata clínica y sin zapatos, la medición de la talla (m) en posición erecta, con talones juntos y los pies separados en un ángulo de 60°, con la cabeza en un plano horizontal de Francfort (línea imaginaria que une el borde superior del conducto auditivo con la órbita), brazos libres a los costados y las palmas hacia las caderas. Se calculó el índice de masa corporal (IMC), con la ecuación de Quetelet (peso/talla²).
- Se midió el perímetro abdominal con cinta métrica que se tomó del centro del ombligo, de igual forma con cadera que se midió a la altura de la cresta iliaca y se calculó el índice cintura cadera (ICC).

- Realización de la Bioimpedancia eléctrica para la estimación del % de grasa corporal, masa magra (kg) y el agua corporal total. La medición se realizó con el equipo marca TANITA modelo TBF 300 GS. Se colocó al sujeto vestido de pie y descalzo y con la vejiga totalmente vacía, sin artículos de metal (ya que pueden distorsionar las medidas de impedancia) con los brazos separados ligeramente, de manera que no tocaran los lados del tronco y las piernas separadas para que los tobillos estuvieran al menos 20 cm de distancia. Las medidas de impedancia se tomaron en ayuno (8 hrs) y sin previo ejercicio fuerte (al menos 24 hr) ya que se puede afectar la hidratación.
- Además a cada paciente se le colectaron 13 ml de sangre venosa. 10 ml se sirvieron en tubo Vacutainer sin anticoagulante (rojo), se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos para la obtención de suero y de inmediato realizar la cuantificación de glucosa, colesterol total (CT), triglicéridos (TG), lipoproteínas de alta densidad (HDL), proteínas totales y ácido úrico por métodos enzimáticos colorimétricos. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se calcularon con la ecuación de Friedewald ($LDL = CT - (HDL + TG/5)$).
- Se hicieron alícuotas del suero en 4 tubos eppendorff de 500 μ L y se congelaron a -20°C (durante un mes) para cuantificación de Glutathion peroxidasa (GPx), glutathion reductasa (GRd), superóxido dismutasa (SOD) y mieloperoxidasa (MPO) por la técnica de ELISA.
- 3 mL se colectaron en tubo con anticoagulante EDTA y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos para la separación del plasma e inmediatamente realizar la determinación de la concentración de los PAOPs.

METODO UTILIZADO PARA MEDIR LOS PAOP.

Material Requerido:

- Tubos de ensayo
- Celdas
- Espectrofotómetro
- Reactivos

Reactivos:

1. Cloramina T a concentración de 100 μ M
2. Ioduro de potasio (KI) a concentración de 1.16 M
3. Solución amortiguadora PBS
4. Acido acético al 99%

PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

- Se prepara la solución de cloramina T para calibración de la curva estandar, en una concentración 100 μ M

Procedimiento:

Se pesa 0.0031g de *Chloramine T hydrate Lot # 125K0731 SIGMA- ALDRICH* y se disuelven en 100 ml de H₂O destilada.

- Se prepara la solución de ioduro de potasio en una concentración 1.16M.

Procedimiento:

Se pesa 1.925 g de *Potassium iodide Lot # 0001437438 SIGMA- ALDRICH* y se disuelve en 10 ml de H₂O destilada.

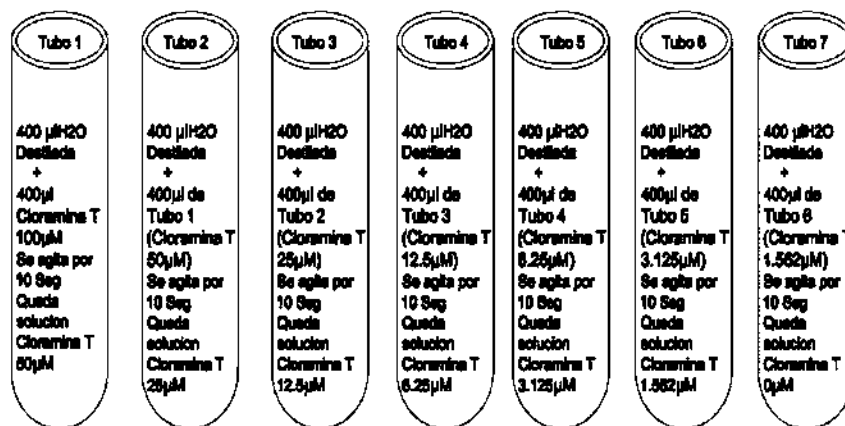
- Se prepara la solución de PBS para blanco.

Se pesa 10.2 g de *PBS Buffer Powder Lot #0608815 SIGMA-ALDRICH* y se disuelven en 1 lt de H₂O destilada.

La determinación de los PAOP se realiza a partir de una curva de calibración, utilizando como patrón de referencia cloramina T.

PROCEDIMIENTO DE LA CURVA ESTANDAR

Se preparan las diluciones para la curva estándar.



NOTA: Después de la dilución agregar a cada tubo 40 µl de Ácido Acético + 20 µl de KI 1.16 M

- A cada uno de los tubos anteriores, en sus diferentes concentraciones, se les agrega 40 µl de *ácido acético Lot # 01315KE SIGMA-ALDRICH al 99%*, y se agrega 20 µl de la solución de yoduro de potasio 1.16M, se mezcla y se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm.

La absorbancia de la reacción fue determinada inmediatamente a 340 nm, la concentración de PAOP fue expresada como µM de cloramina T.

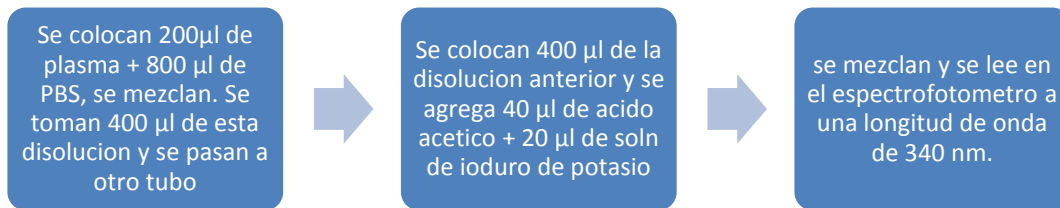
PARA LA MUESTRA DE CADA PACIENTE:

Se debe hacer una disolución 1:5 de la muestra de plasma con PBS

Se colocan 200 µl de plasma, se agregan 800 µl de solución de PBS, se mezclan.

Se toman 400 µl de esta solución y se pasan a otro tubo, se agregan 40 µl de ácido acético + 20 µl de solución de KI 1.16M.

Se mezclan y se leen en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm.



PROTEINAS TOTALES

Procedimiento: se colocan 20 µl de la muestra (suero), con 1000 µl de reactivo de Biuret, se mezcla y se incuba a 25°C durante 30 min. Se mide la absorbancia de la muestra y del patrón frente al reactivo blanco, a una longitud de onda de 546 nm.

ACIDO URICO

Procedimiento: En un tubo de vidrio, se colocan 20 µl de muestra (suero) con 1000 µl de reactivo enzima, se mezcla y se incuba 5 minutos a 37°C. Se mide la absorbancia de la muestra y del patrón frente al reactivo blanco durante los 15 min siguientes, a una longitud de onda de 546 nm.

TRIGLICERIDOS

Procedimiento: En un tubo de vidrio, se colocan 10 µl de muestra (suero) con 1000 µl de reactivo enzima, se mezcla y se incuba a 37°C durante 5 min. Se mide la absorbancia de la muestra y del patrón frente al reactivo blanco al cabo de 60 min, a una longitud de onda de 546 nm.

COLESTEROL

Procedimiento: En un tubo de vidrio se colocan 10 µl de muestra (suero) con 1000 µl de reactivo, se mezcla, se incuba a 37°C durante 5 minutos y se mide la absorbancia de la muestra y del patrón frente al reactivo blanco antes de 60 min, a una longitud de onda de 546 nm.

COLESTEROL HDL

Procedimiento: En un tubo de vidrio, se colocan 200 µl de muestra (suero) con 500 µl de reactivo precipitante, se mezcla y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm. Separar el sobrenadante y en el mismo realizar la determinación de colesterol antes de que transcurran 2 horas. Se realiza la medida de colesterol por el método CHOD PAP. Se toman 100 µl del sobrenadante con 1000 µl de reactivo de colesterol, se mezcla se incuba a 37°C durante 5 minutos. Se mide la absorbancia de la muestra y del patrón frente al reactivo blanco durante los 15 min siguientes, a una longitud de onda de 546 nm.

GLUCOSA

Procedimiento: En un tubo de vidrio se colocan 10 µl de muestra (suero) con 1000 µl de reactivo, se mezcla, se incuba a 37°C durante 10 minutos y se mide la absorbancia de la muestra y del patrón frente al reactivo blanco antes de 60 min, a una longitud de onda de 546 nm.

CUANTIFICACION DE ENZIMAS DE ESTRÉS OXIDATIVO

- *Myeloperoxidase (human) EIA kit cat No. 585001, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA.*
- *Superoxide Dismutase Assay kit cat No. 706002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA.*
- *Glutathione Peroxidasa Assay kit cat No. 703102, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA.*
- *Glutathione Reductase Assay kit cat No. 703202, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA.*

Las enzimas mencionadas se cuantificaron por el método de ELISA. Ensayo enzimático para la medida cuantitativa en suero humano.

XII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan en promedio \pm desviación estándar. Se realizó prueba t de Student para muestras independientes para la comparación entre los grupos con RI y sin RI. Se realizó la correlación de Pearson para determinar la asociación entre las variables. Se estableció diferencia estadística significativa con $p < 0.05$. Los datos se analizaron en el programa computacional SPSS versión 18.0 para Windows.

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION	ESCALA DE MEDICION
Edad	Edad del paciente medida en años	Continua, años
Peso	Peso del paciente en Kg	Continua, Kg
Talla	Estatura del paciente en metros	Continua, en metros y centímetros
Presión sistólica	Medición en baumanómetro de mercurio	Continua, milímetros de mercurio
Presión diastólica	Medición en baumanómetro de mercurio	Continua, milímetros de mercurio
Índice de Masa Corporal (IMC)	Calculada por la ecuación de Quetelet, de acuerdo a la NOM de obesidad	Continua, (peso/talla ²) Kg/m ²
Circunferencia de cintura	Medición del perímetro de la cintura en centímetros	Continua, en centímetros
Circunferencia de cadera	Medición del perímetro de la cadera en centímetros	Continua, en centímetros
Glucosa	Concentración sérica de	Continua, miligramos por

	glucosa	100 ml
Colesterol total	Concentración sérica de colesterol cuantificado por método enzimático colorimétrico.	Continua, miligramos por 100 ml.
Colesterol de alta densidad (HDL)	Colesterol asociado a las lipoproteínas, cuantificado en suero por método enzimático colorimétrico	Continua, miligramos por 100 ml
Colesterol de baja densidad (LDL)	Colesterol asociado a las lipoproteínas cuantificado en suero por método enzimático colorimétrico	Continua, miligramos por 100 ml
Triglicéridos	Concentración de triglicéridos cuantificados en suero por método enzimático colorimétrico	Continua, miligramos por 100 ml
Insulina	Hormona secretada por el páncreas y cuantificada en suero por ELISA.	Cuantitativa, continua, unidades internacionales.
Proteínas totales	Es una medición aproximada de todas las proteínas encontradas en la porción líquida de la sangre. Son cuantificadas en suero por métodos enzimáticos colorimétricos.	g/dl
Acido úrico	Producto del metabolismo del metabolismo del	mg/dl

	nitrógeno y es cuantificado en suero por métodos enzimáticos colorimétricos.	
Productos avanzados de oxidación proteica (PAOPS)	partes de proteínas en proceso de oxidación cuantificadas en plasma.	μmol/L
Glutation Reductasa (GRd)	Enzima de oxidación que permite mantener concentraciones de GSH para la eliminación de H ₂ O ₂ . Cuantificada en suero por método de ELISA.	nmol/min/ml
Glutación Peroxidasa (GPx)	Enzima de oxidación que protege de la toxicidad de hidroperóxidos. Se cuantifica en suero por método de ELISA.	nmol/min/ml
Mieloperoxidasa (MPO)	Enzima de defensa de los leucocitos con actividad microbicida usando H ₂ O ₂ . Se cuantifica en suero por el método de ELISA.	pmol/L

CONSIDERACIONES ETICAS

Los procedimientos propuestos están de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, así como los códigos y normas Internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Además de todos los aspectos en cuanto al cuidado que se deberá tener con la seguridad y bienestar de los pacientes se respeta cabalmente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki y sus enmiendas, el Informe Belmont, el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos (Regla Común).

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud en su título segundo, capítulo 1, artículo 13.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Artículo 14.- La investigación que se realice en seres humanos deberá desarrollarse conforme a las siguientes bases: se ajustará a los principios científicos y éticos que la justifiquen, contará con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal. Artículo 16.- En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo solo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice. Artículo 17.- Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. Para efectos de este estudio y apegados a este reglamento, la investigación se clasifica en la siguiente categoría:

Categoría II. Investigación con riesgo mínimo: ya que se trata de un estudio comparativo y transversal, en el cual se realizarán procedimientos comunes de medición de la presión arterial, colecta de sangre venosa y preguntas dirigidas al paciente en estudio.

XIII. RESULTADOS

Se estudiaron 87 pacientes con obesidad que se captaron en la Unidad de Medicina Familiar N° 80 del Instituto Mexicano del Seguro Social. La edad promedio fue de 38.94 ± 9.74 años. El 72.7 % tuvieron antecedentes heredofamiliares de DM2 y el resto solo de HTA. Se dividieron en 2 grupos según la presencia de resistencia a la insulina. Se definió RI cuando el valor de HOMA es ≥ 2.5 .

Los parámetros clínicos de los pacientes de estudio se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Parámetros clínicos y antropométricos de los pacientes con obesidad.

	GRI N=45	GSRI N=42	p*
Edad (años)	39.60 ± 9.50	38.10 ± 10.11	0.476
Peso (kg)	70.01 ± 12.55	70.78 ± 10.98	0.761
Talla (m)	1.56 ± 0.09	1.58 ± 0.07	0.293
IMC	28.95 ± 4.17	28.28 ± 4.25	0.463
GC (%)	36.23 ± 6.83	34.53 ± 8.04	0.290
Cintura (cm)	93.58 ± 9.86	90.38 ± 10.46	0.146
TAS	109.00 ± 15.09	107.02 ± 12.54	0.510
TAD	71.00 ± 10.14	69.95 ± 9.91	0.628

GRI: Grupo con Resistencia a la Insulina; GSRI: Grupo Sin Resistencia a la Insulina; IMC: Índice de Masa Corporal; GC: Grasa Corporal; TAS; tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica. Los datos se muestran en promedio \pm desviación estándar. Prueba t de Student para muestras independientes. *P < 0.05

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos en estudio lo que nos habla de una homogeneidad con respecto a la edad, IMC y % de grasa corporal, en la muestra de estudio.

Los parámetros bioquímicos se muestran en la tabla 5.

TABLA 5. Parámetros bioquímicos de los pacientes con obesidad

	GRI N=45	GSRI N=42	P*
Glucosa (mg/dl)	93.34 ± 14.54	84.41 ± 12.79	0.003
Colesterol (mg/dl)	193.76 ± 38.49	193.03 ± 43.95	0.934
Triglicéridos (mg/dl)	180.35 ± 83.99	160.45 ± 85.91	0.278
LDL (mg/dl)	128.07 ± 37.61	135.47 ± 39.49	0.382
HDL (mg/dl)	27.52 ± 11.96	26.97 ± 11.23	0.828
VLDL (mg/dl)	36.47 ± 16.62	32.73 ± 16.88	0.309
Acido Urico (mg/dl)	4.57 ± 0.74	4.58 ± 0.87	0.952
Proteínas Totales (g/dl)	8.22 ± 0.48	8.35 ± 0.53	0.208
Insulina (UI/ml)	18.40 ± 6.28	9.59 ± 1.72	0.0001
Resistencia a la insulina	4.23 ± 1.60	1.98 ± 0.36	0.0001

GRI: Grupo con Resistencia a la Insulina; GSRI: Grupo Sin Resistencia a la Insulina; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; HDL: Lipoproteínas de alta densidad. Los datos se muestran en promedio ± desviación estándar. Prueba t de Student para muestras independientes. P < 0.05

Se observa que los triglicéridos se encontraron por arriba de los valores normales (150 mg/dL) en los dos grupos en estudio y el colesterol LDL (LDL < 130 mg/dl) solo se encontró un poco más elevado en el grupo sin resistencia.⁵⁶

En la figura 1 se muestra la gráfica de los productos de oxidación proteica en ambos grupos de estudio, mostrándose mayor concentración en el grupo que presenta resistencia a la insulina.

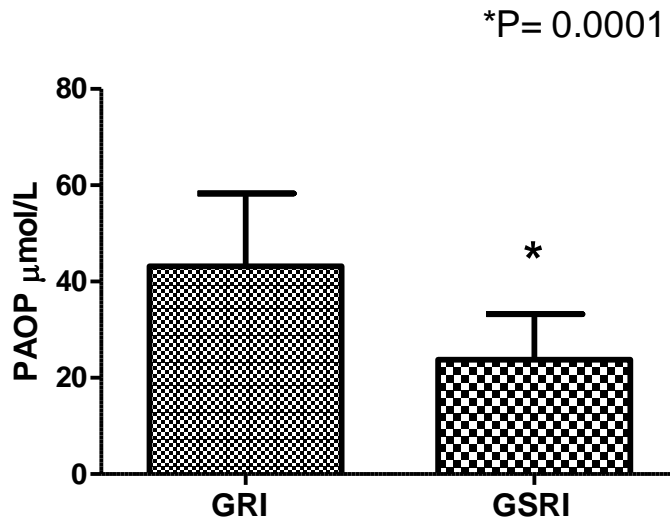


FIG 1. Productos Avanzados de Oxidación Protéica en el Grupo con Resistencia a la Insulina (GRI) y el Grupo sin Resistencia a la Insulina (GSRI).

** Prueba t Student para muestras independientes*

La actividad que presenta la enzima glutatión reductasa en cada uno de los grupos de estudio se muestra en la figura 2.

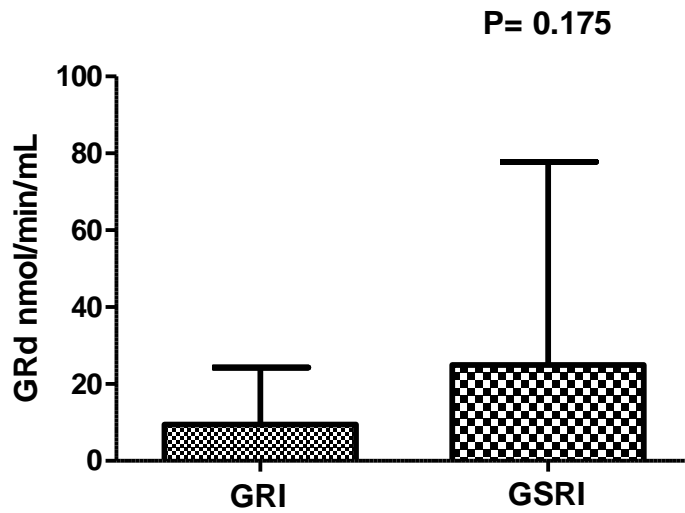


FIG 2. Actividad de la Glutathione Reductasa en el Grupo con Resistencia a la Insulina (GRI) y el Grupo sin Resistencia a la Insulina (GSRI).

**Prueba t Student para muestras independientes*

En la figura 3 se representa la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en cada uno de los grupos de estudio. No se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos en estudio, sin embargo se observa una tendencia al incremento en la actividad de esta enzima en el GSRI.

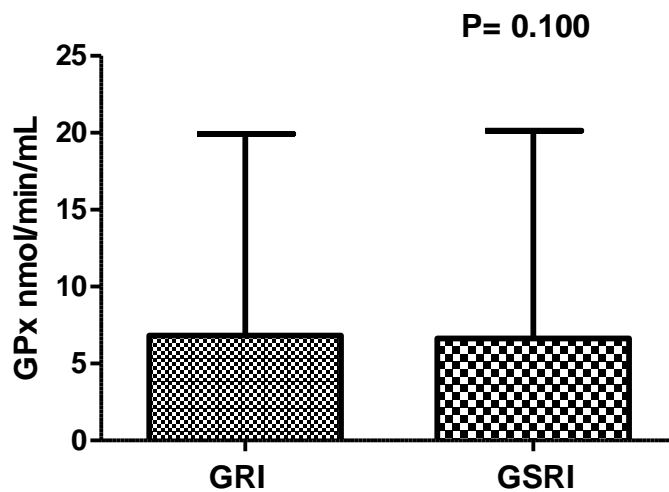


FIG 3. Actividad de la Glutathion Peroxidasa en el Grupo con Resistencia a la Insulina (GRI) y el Grupo sin Resistencia a la Insulina (GSRI).

*Prueba t Student para muestras independientes

Con respecto a la actividad que presenta la enzima superóxido dismutasa en cada uno de los grupos de estudio, se encontró un incremento de la actividad de la SOD en el GRI.

(Figura 4).

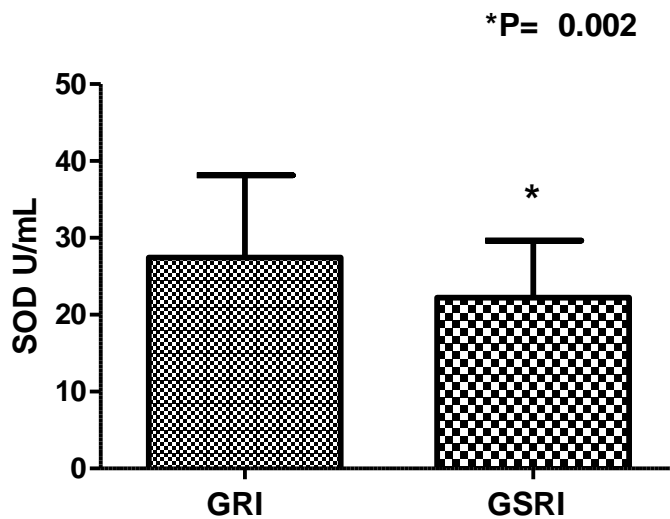


FIG 4. Actividad de la Superóxido Dismutasa en el Grupo con Resistencia a la Insulina (GRI) y el Grupo sin Resistencia a la Insulina (GSRI).

**Prueba t Student para muestras independientes*

En la figura 5, se muestra la concentración de la enzima mieloperoxidasa en cada uno de los grupos de estudio demostrando un incremento significativo de la MPO en el grupo con RI.

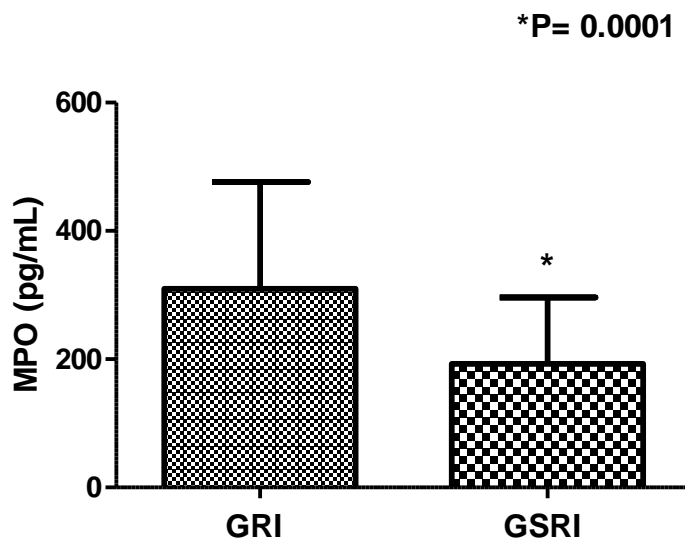


FIG 5. Actividad de la Mieloperoxidasa en el Grupo con Resistencia a la Insulina (GRI) y el Grupo sin Resistencia a la Insulina (GSRI).

**Prueba t Student para muestras independientes*

Al realizar el análisis de correlación entre las diferentes variables se encontró asociación positiva y significativa estadísticamente entre la concentración de insulina sérica con la circunferencia de cintura, (Figura 6) en los pacientes con obesidad.

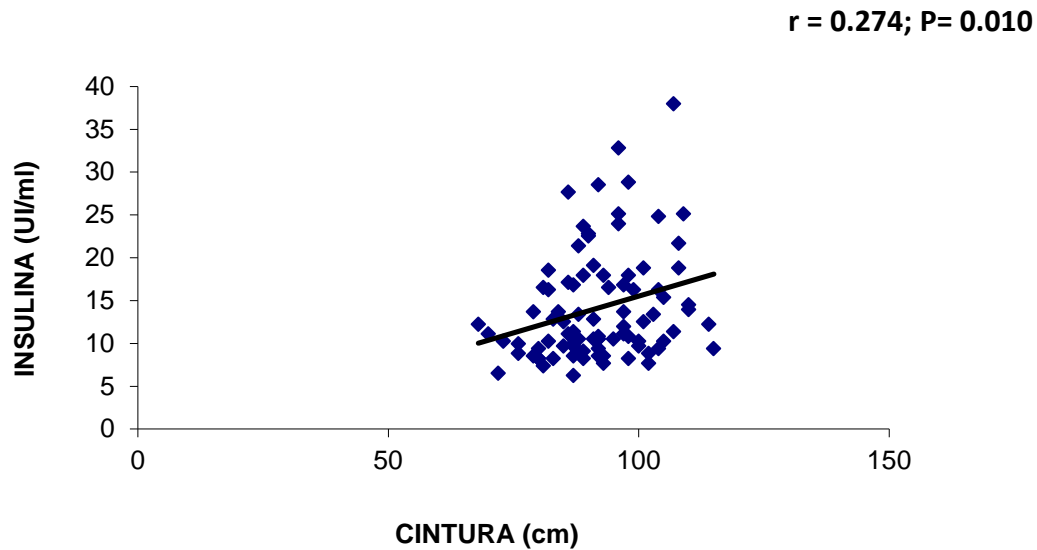


FIG.6. Correlación entre insulina y cintura en familiares de pacientes con DM2 y/o HTA.

Se encontró asociación entre PAOP y el índice para estimar RI (HOMA) en los pacientes con obesidad. (Figura 7).

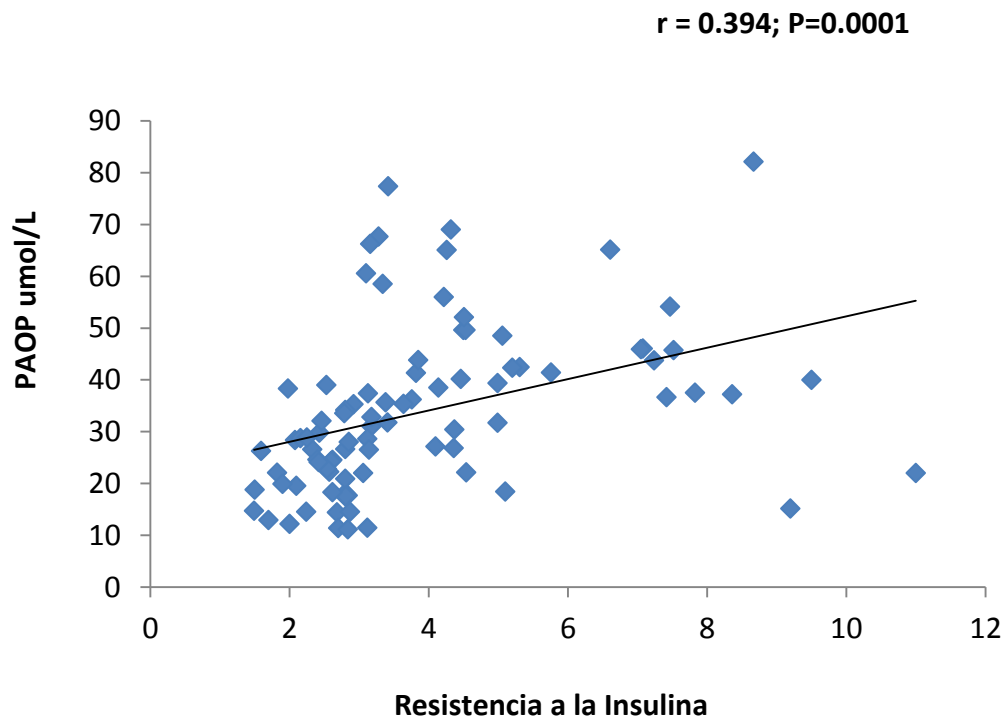


Fig 7. Correlación entre los Productos Avanzados de Oxidación Proteica y Resistencia a la Insulina en familiares de pacientes con DM2/HTA.

En la figura 8 se observa la correlación negativa entre la actividad de la Glutation reductasa (GRd) y la glucosa sérica en los pacientes con obesidad.

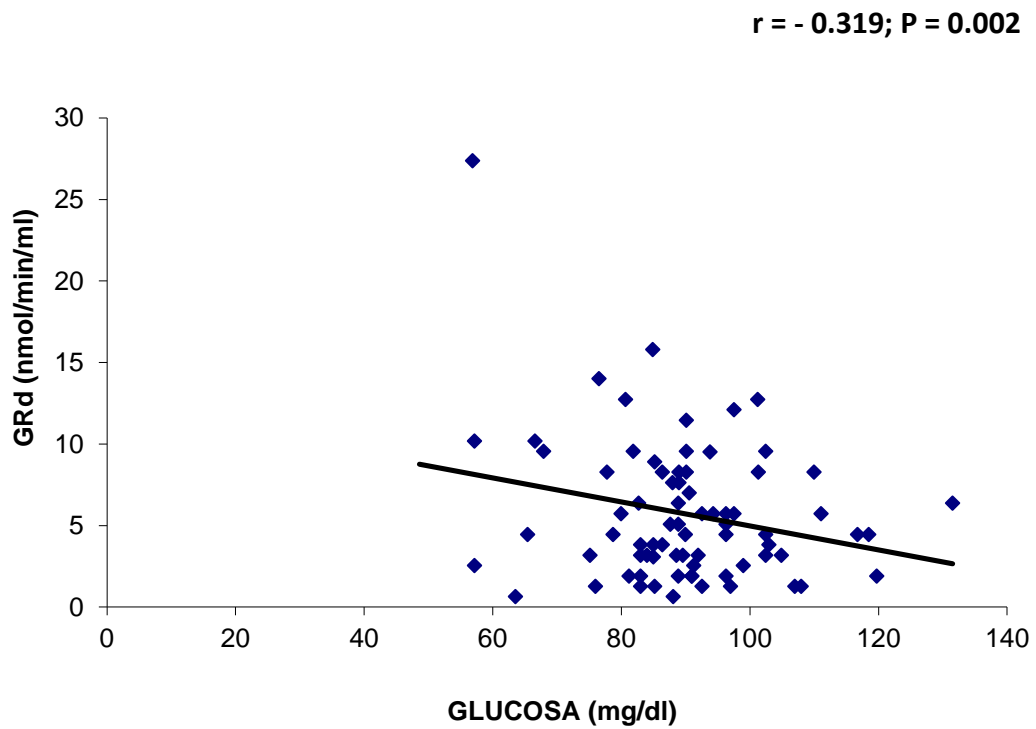


FIG 8. Correlación entre la actividad de la GRd y la glucosa en familiares de pacientes con DM2 y/o HTA.

Así mismo se encontró correlación positiva entre la mieloperoxidasa y la resistencia a la insulina evaluada por el índice de HOMA en los pacientes con obesidad. (Figura 9).

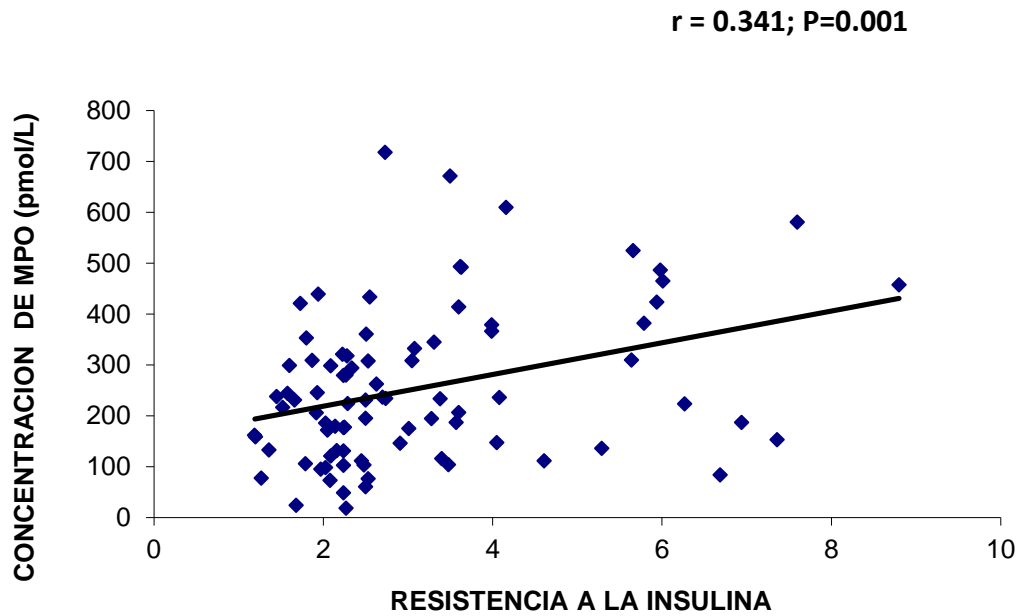


FIG 9. Correlación entre la concentración de MPO y Resistencia a la Insulina en familiares de pacientes con DM2 y/o HTA.

XIV. DISCUSION

Uno de nuestros principales objetivos de este estudio fue conocer si el estrés oxidativo y los productos avanzados de oxidación proteica se asocian con resistencia a la insulina en individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HTA. En base a nuestros resultados confirmamos la asociación entre el estrés oxidativo, los productos avanzados de oxidación proteica y la RI.

Se conoce que la obesidad predispone o se asocia a la hiperinsulinemia por resistencia a la insulina, mientras el valor del IMC se relaciona de manera directa y proporcional con la RI.⁵⁷

Reportes en la literatura mencionan que los sujetos con antecedentes patológicos familiares de DM2 presentan más RI, hiperinsulinemia y dislipidemia cuando se compara al otro grupo conformado por sujetos sin antecedentes patológicos familiares de diabetes tipo 2.⁶⁰⁻⁶³ En este estudio la muestra fue en pacientes con obesidad y todos tenían el antecedente heredofamiliar de DM en primer grado, sin embargo al momento de clasificar en grupos de acuerdo a la RI, encontramos que 45 (51.72%) pacientes cursan con RI y 42 (48.28%) no tuvieron RI lo que nos indica que 1 de cada 2 pacientes con obesidad y con el antecedente de DM puede tener RI, cifra semejante a la reportada por Goldin y cols, donde mencionan que los sujetos con antecedentes personales de DM2 tienen una predisposición de hasta un 40 % de presentar hiperinsulinemia por mayor resistencia a la insulina y síndrome metabólico concomitante.⁶²

Hoy en día la obesidad es un problema grave de salud que preocupa a la sociedad en común, ya que debido a este problema en la población, se corre un riesgo de presentar varias enfermedades graves, de tratamientos largos e incluso incurables, tal es el caso de la DM2; por ello, nos resulto interesante plantearnos un estudio con una población con problemas de obesidad, en la que podíamos estudiar los procesos oxidativos, las enzimas que intervienen en dichos procesos y la insulina.

Nuestros grupos fueron homogéneos en cuanto a la edad, IMC y porcentaje de grasa corporal por lo que podemos comentar que estas variables no están influyendo en las variables en estudio. (RI, estrés oxidativo, PAOPS).

Encontramos que hay una significancia entre el grupo con RI y sin RI con respecto a la glucosa, a pesar de que se encuentra dentro de los valores normales, hay concentraciones mas altas en el grupo con RI, puede ser causada por un defecto en el transporte de la glucosa, el cual puede ser inherente a un defecto en los tejidos o ser el resultado de un factor como la glucotoxicidad propia de la hiperglucemia o a un incremento de la concentración sérica de ácidos grasos libres.⁶⁴

Se conoce que el estrés oxidativo ocasionado por el incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) o su inadecuada eliminación, desempeñan un papel clave en la génesis de distintas enfermedades, entre ellas la DM. Varios investigadores^{20,21,23,24} durante los últimos años, han propuesto que el estrés oxidativo es uno de los mediadores responsables de causar DM2.

A la fecha no existe un método estandarizado en la clínica para la determinación de los radicales libres in vivo. En el 2002 se propone los PAOP como un marcador adicional de estrés oxidativo.⁶² Los PAOP se originan como resultado de la acción de los radicales libres en las proteínas. Nosotros hemos encontrado una concentración alta de PAOP en el grupo con RI, siendo estadísticamente significativa, lo cual indica que las proteínas si están sufriendo daño oxidativo, en estos pacientes.

Se ha reportado que los PAOP están aumentados en pacientes con síndrome coronario agudo⁶³ y en pacientes con insuficiencia renal⁶⁵ En los pacientes con RI y con el antecedente familiar de DM2 los encontramos elevados lo que nos habla de que los PAOP podrían ser un probable factor de riesgo adicional para el desarrollo de DM2 y a futuro enfermedad cardiovascular o renal.

Se conoce que todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan ERO. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células

mecanismos de defensa que las neutralicen. A estas defensas se les denomina antioxidantes. Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas y eliminadores de radicales, entre ellas se encuentra la SOD, la GPx, la GRd y la MPO.

En los pacientes con antecedentes heredofamiliares de DM y con obesidad, la actividad que presenta la SOD y la MPO son estadísticamente significativas con mayor concentración en el grupo con RI, la primera convierte el radical anión en peróxido y la segunda utiliza el peróxido convertido para su actividad, este incremento en la actividad de la SOD puede ser debida a que el estado de RI este generando una mayor cantidad de ERO de forma tal que pueda estar sobrepasando la capacidad neutralizante de la SOD y generando una mayor concentración de H_2O_2 y un incremento en la actividad de la MPO para la conversión al ión hipoclorito y su futura conversión a oxígeno singlete.

Sin embargo, la actividad de la enzima oxidativa glutatión reductasa (GRd) y de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), se muestran en menor concentración en el grupo con RI, esto es debido a que la GPx y la GRd se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd) que se activa a concentraciones bajas de H_2O_2 , existe otra enzima que es la catalasa que actúa a en presencia de concentraciones altas de H_2O_2 . Una de las limitaciones de este estudio fue el no haber podido cuantificar la enzima catalasa, pero de acuerdo a lo anterior nos sugiere que su actividad podría estar incrementada para neutralizar el H_2O_2 .

La correlación que existe entre cintura e insulina en los pacientes con obesidad, se muestra estadísticamente significativa ($p = 0.010$), lo cual indica que mientras mas obesa sea una persona, mas insulina secreta la célula beta del páncreas.⁶⁶ Se conoce que el incremento en las concentraciones circulates de insulina, ácidos grasos libres o glucosa da como resultado un incremento en las ERO activando las vías del estrés oxidativo y dañando a su vez la acción y secreción de la insulina. La correlación entre la actividad de la enzima MPO con RI se muestra estadísticamente significativa ($p= 0.001$), esto sugiere que la actividad de dicha enzima se encuentra implicada en el daño tisular durante condiciones de inflamación del endotelio vascular y podría caracterizarse como un factor

de riesgo para enfermedad cardiovascular a futuro en nuestra muestra de estudio ya que diversas líneas de evidencia sugieren que las consecuencias biológicas proaterogénicas pueden ser desencadenadas por modificaciones oxidativas en el endotelio vascular debido al incremento de las especies reactivas generadas por la MPO.⁶⁷ Debido a la prevalencia de obesidad, DM2 e HTA, la detección temprana e identificación de grupos de riesgo como son los familiares de pacientes con DM2 y/o HAS y además con el factor de riesgo de la obesidad central, es de importancia el realizar estudios moleculares y con tratamiento farmacológico a largo plazo para evaluar las modificaciones que podrían ocurrir en el estrés oxidativo para así reducir las consecuencias de estos problemas de salud.

XV. CONCLUSIONES

- 1.- La resistencia a la insulina es un factor de riesgo en los pacientes con obesidad y se asocia con la patogénesis de DM2 y enfermedades cardiovasculares.
- 2.- Uno de cada 2 pacientes con obesidad y con factores heredofamiliares de DM2 y/o HAS tienen RI.
- 3.- Los pacientes con obesidad y RI tienen un mayor desequilibrio en el sistema enzimático antioxidante lo que condicionará daño en la célula beta y endotelio vascular.
- 4.- Los pacientes con obesidad y con RI tienen una mayor concentración de PAOP lo que condicionará una mayor disfunción del adipocito.
- 5.- Existe asociación del estrés oxidativo, PAOP y RI en los pacientes con antecedentes heredofamiliares de DM2 y/o HAS con obesidad.

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS A FUTURO

Al poder identificar en este tipo de pacientes el riesgo de tener a futuro DM2, se podrá hacer conciencia en la población y establecer protocolos de investigación para establecer más estrictamente cambios en el estilo de vida (alimentación y actividad física) o intervenir de manera farmacológica con algún medicamento, de forma temprana para modificar la lesión por RI, disminuir el estrés oxidativo y la actividad de PAOPs

XVI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Grundy SM, Benjamin IK, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease. A statement for health care professionals from American Heart Association. *Circulation* 1999;100:1134-1146.
2. Freeman Ms, Mansfield MW, Barrett JH, Grant PJ. Heritability of features of the insulin resistance syndrome in a community-based study of health families. *Diabet Med* 2002;19(12):994-999.
3. González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Cardona-Muñoz EG, Lifshitz A, Quiñones-Galvan A. Metabolic profile and insulin sensitivity in health young Mexicans with strong family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the paternal Branch. *Arch Med Res* 1997;28:421-424.
4. Gómez-García A, Magaña-Garns P, Ruiz-García J, Alvarez Aguilar C. Sensibilidad a la insulina y función de la célula beta en los diferentes estados de tolerancia a la glucosa. *Invest clin* 2006;47(2):155-166.
5. Gungor N, Bacha F, Saad R, Janosky J, Arslanian S. Youth type 2 diabetes. Insulina resistance, β -cell failure, or both? *Diabetes Care* 2005;28:638-644.
6. Kahn SE, Porte Jr D. Pathophysiology of type II diabetes mellitus. En: Porte Jr D, Sherwin RS, editors. *Diabetes mellitus*. Stamford CT: Appleton and Lange; 1996:487:512.
7. Pratley RE, Weyer C. Progression from IGT to type 2 diabetes mellitus: the central role of impaired early insulin secretion. *Curr Diab Rep* 2002;2(3):242-248.
8. Pérez L, Pérez J. Método para medir el daño oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2000; 29 (3):192-198.
9. Rodríguez J, Venéreo J, Acosta E. Presente y futuro de los antioxidantes en el tratamiento de la hipertensión arterial esencial. *Rev Cubana Med Milit* 2002; 31 (4): 291-298.
10. Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 23-247.

11. González B. Progresión de la insuficiencia renal crónica y estrés oxidativo [en línea] 2001. URL disponible en: <http://www.uninet.edu/cin2001/html/conf/basilia.html> [Fecha de acceso 28 de noviembre de 2012]
12. Draï J, Bannier E, Chazot C, Hurot JM, Goedert G. Oxidants and antioxidants in long-term haemodialysis patients. *Farmacol* 2001; 56(5-7):463-5.
13. Descamps - Latscha B, Witko - Sarsat V. Oxidative stress in chronic renal failure and hemodialysis. *Nephrologie* 2003; 24(7):377-9.
14. Witko - Sarsat V, Gausson V, Descamps - Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins?. *Kidney Int* 2003;(84):511-4.
15. Descamps - Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 78:108-13.
16. American Diabetes Association (ADA). Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Report of the Experts. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-97
17. American Diabetes Association (ADA): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab Care* 1998; 21 (suppl1) S5-S19
18. Abreu L.M. Fundamentos de el Diagnostico (Las bases Fisiopatologicas para la Interpretación de los Fenomenos Clínicos. Mendez editores, 1993. Pags. 440-441
19. Ministerio de Sanidad y Consumo. Informe Salud y Género 2005. *Rev. Gaceta sanitaria* 2006; 20 (Supl.1):15-24.
20. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Provisional Report of WHO Consultation. *Diabetic Med* (1998) 15: 539-55
21. American Diabetes Association (ADA): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab Care* 1998;21 (suppl 1) S5-S19.
22. Martínez J. A, Moreno M. J, Marques-Lopez, Martí A., Causas de obesidad. *ANALES Sis Navarra* 2002; Vol 25, suplemento 1
23. Haffner S, Taegmeyer H et al. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation* 2003;108: 1541-45.

24. Sanchez-Castillo CP, Pichardo- Ontiveros E, Lopez-R P. Epidemiologica de la obesidad. Gac Med Mex 2004; 140 (Suppl 2): S3-S20
25. Murano ST, Shmookler-Reis JK. Diverse gene sequences are overexpressed in diabetes mellitus. Mol Cell Biol 2002; 11:3905-3914.
26. Primetau V, Coderre L, Karelis A, Brochu M, Lavoie M, Messier V, Sladek R, Rabasa-Lhoret R. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. Int J Obes 2010; 34(1):1-11)
27. Martinez Valls J, Resistencia a la Insulina, Intern Med 2003; 14: 101
28. Avila, A, Chavez, A y Shamah, T, Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ENURBAL-1995), México, D.F. INNSZ, 1995.
29. COMUZZIE AG, ALLISON DB. The search for human obesity genes. Science 1998; 280: 1374-1377.
30. Ferrannini E, Andrea M. How to measure insulin sensitivity. J Hypertens 1998; 16: 895-906.
31. Gómez García A, Magaña Garns P, Ruiz García J, Alvarez Aguilar C. Sensibilidad a la insulina y función de la célula beta en los diferentes estados de tolerancia a la glucosa. Invest Clin 47(2): 155- 166, 2006.
32. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28:412– 419, 1985
2. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR: Use and abuse of HOMA modeling. Diabetes Care 27:1487–1495, 2004
33. Perez Gastell PL, Perez de Alejo JL. Métodos para medir el daño oxidativo. Rev Cubana Med Milit 2000; 29 (3) : 192-198.
34. Lovatand DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins
35. Martinez Cayuela M, Sánchez de Medina Contreras F. Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante. En Gil Hernández A, Ruiz Lopez M, Sastre Gallego A, et. Al.

- Coordinadores Nutrición Clínica 1º ed. Madrid, MC Graw-Hill interamericana; 2001.p. 91-
36. González B. Progresión de la insuficiencia renal crónica y estrés oxidativo [en línea] 2001. URL disponible en:
<http://www.uninet.edu/cin2001/html/conf/basilia.html> [Fecha de acceso 28 de enero de 2013]
37. Draï J, Bannier E, Chazot C, Hurot JM, Goedert G. Oxidants and antioxidants in long-term haemodialysis patients. *Farmacol* 2001; 56(5-7):463-5.
38. Descamps - Latscha B, Witko - Sarsat V. Oxidative stress in chronic renal failure and hemodialysis. *Nephrologie* 2003; 24(7):377-9.
39. Witko - Sarsat V, Gausson V, Descamps - Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins?. *Kidney Int* 2003;(84):511-4.
40. Dukan, S., et al. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**:5746-5749 (2000).
41. Nyström, T. Translational fidelity, protein oxidation and senescence: lessons from bacteria. *Aging Res.Rev.* **1**:693-703 (2002).
42. Stadtman, E.R. Protein oxidation and aging. *Science* **257**:1220-1224 (1992).
43. Stadtman, E.R. & Levine, R.L. Protein oxidation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **899**:191-208 (2000).
44. Diaz A, Membrillo H,J. Consecuencias fisiológicas en la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Rev especializada en ciencias biológicas*, vol.9 num. 1, 2006 p.p. 34-44
45. Cabiscol, E., Tamarit, J. & Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl.Microbiol.* **3**:3-8 (2000).
46. Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**:1311-1317 (2005).
47. Oliver, C.N. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch.Biochem.Biophys.* **253**:62-72 (1987).
48. Cakatay, U., et al. Oxidative protein damage in type 1 diabetic patients with and without complications. *Endocr.Res.* **26**:365-379 (2000).

49. Telci, A., et al. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm.Metabol.Res.* **32**:40-43 (2000).
50. Himmelfarb, J., et al. Plasma protein oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* **58**:2571-2578 (2000).
51. Himmelfarb, J. & McMonagle, E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* **60**:358-363 (2001).
52. Mattson, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* **430**:631-639 (2004).
53. Castegna, A., et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Rad.Biol.Med.* **33**:562-571 (2002).
54. Castegna, A., et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, α -enolase and heat shock cognate 71. *J.Neurochem.* **82**:1524-1532 (2002).
55. Bosnia, F., et al. Protein oxidation and lens opacity in humans. *Invest. Ophthalmol.Vis.Sci.* **41**:2461-2465 (2000).

56. .- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-2497.
57. (Bonora E, Kiechl S, Willeint J, Oberhollenzer F, Egger G, Tagher G, et al. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck study. *Diabetes.* 1998;47:1643-9.)
58. Goran MI, Bergman RN, Avila Q, Watkins M, Ball GD, Shaibi GG, et al. Impaired glucose tolerance and reduced B-cell function in overweight latino children with a positive family history for type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol. Metab.* 2004;89:207-12.

59. Cruz ML, Weigensberg J, Huang TTK, Ball G, Shaibi G, Goran M. The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:108-13.
60. Goldin LR, Camp NJ, Keen KJ, Martin LJ, Moslehi R, Ghosh S, et al. Analysis of metabolic syndrome phenotypes in Framingham heart study families from genetic analysis workshop
61. *Genet Epidemiol.* 2003;25(1):78-89.46.-Hauser ER, Mooser V, Crossman DC, Haines JL, Jones CH, Winkelmann B, et al. Design of the genetics of early onset cardiovascular disease (GENECARD) study. *Genetics. Clinical investigations. Am Heart J.* 2003;145:602-13.
62. - Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002;162:221-225.)
63. - (Skvarilova M, Bulava A, Stejskal D, Adammovská S, Bartek J. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary síndrome. *Biomed Papers* 2005;149(1):83-87).
64. - Cernea S, Dobreanu M. Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. *Biochemia Medica* 2013; 23 (3): 266-80.
65. (Drüeke T, Witko-Sarsat V, Massy Z, Descamps-Latscha B, Guerin AP, Marchais SJ, et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in End-Stage Renal Disease. *Circulation* 2002;106:2212-2217).
66. - (Zhou QG, Zhou M, Lou AJ, Xie D, Hou FF. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response and insulin resistance in cultured adipocytes via induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Physiol Biochem* 2010;26(4-5):775-786.)
67. (Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1102-1111.)

XVII. RELACION DE ANEXOS

(ANEXO 1)

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DELEGACION REGIONAL MICHOACAN

UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR NO.80

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION VOLUNTARIA EN PROYECTO DE INVESTIGACION CLINICA.

Morelia, Michoacán a _____

Yo _____

Con número de afiliación: _____ de la UMF No.80 del IMSS.

ACEPTO EN FORMA VOLUNTARIA PARTICIPAR en el proyecto de Investigación titulado:

PRODUCTOS AVANZADOS DE OXIDACION PROTEICA Y RESISTENCIA A LA INSULINA EN FAMILIARES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS.

El cual se encuentra REGISTRADO ante el H. Comité de Investigación Local del HGR No. 1 del IMSS en Morelia, Michoacán con Fecha _____ y con **NºDe Registro:** _____

El objetivo de este trabajo es demostrar si existe alguna asociación entre la concentración de PAOPs y resistencia a la insulina en individuos con antecedentes heredofamiliares de DM2.

Los PAOPs son los productos avanzados de oxidación proteica, esto es que las proteínas de mi cuerpo pueden presentar modificaciones en su estructura que podrían dañar tejidos y acelerar la aparición de la diabetes.

Se me ha explicado que mi participación consiste en acudir en ayuno para una extracción de sangre venosa y algunas preguntas referentes a mi estado de salud. El investigador responsable me ha informado que un probable riesgo de la toma de sangre es un posible moretón, y el inconveniente es la molestia de un piquete al momento de la toma de muestra venosa. El beneficio derivado de mi participación en el estudio es que voy a conocer mi estado de salud y en especial si mi insulina (hormona que secreta el páncreas) está actuando bien, si no está actuando bien, me sugerirán que medidas tomar y si requiero atención médica me enviarán con el médico familiar para mi atención oportuna.

El investigador me ha dicho que tendré acceso a mis resultados y se ha comprometido a responder a cualquier pregunta y aclararme dudas que le plantee acerca de mi participación o cualquier asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que yo lo considere conveniente.

El investigador responsable me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y Firma del Paciente

Investigador Responsable

Testigo

Testigo

Morelia, Mich., a ____ de _____ de 201__.

(ANEXO 2)

HISTORIA CLINICA

FICHA DE IDENTIFICACION

Nombre: _____

Número de afiliación: _____

Consultorio: _____ Turno: _____ UMF: _____

Edad: _____ Sexo: _____ Fecha de Nacimiento: _____ Estado Civil: _____

Religión: _____ Lugar de Origen: _____ Escolaridad: _____

Domicilio: _____

Ocupación: _____

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES.

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS.

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS.

ANTECEDENTES GINECO OBSTETRICOS

Menarca: _____ Ritmo: _____ IVSA: _____ G: _____ P: _____ C: _____

A: _____ Hijos macrosómico: _____

FUR: _____ Ultimo papanicolao: _____ Ultima revisión de mama: _____

INTERROGATORIO POR APARATOS Y SISTEMAS:

Sistema Nervioso: _____

Órgano de los sentidos: _____

Sistema Endocrino: _____

Sistema Hematológico: _____

Sistema Cardiorespiratorio: _____

Sistema Digestivo: _____

Sistema Urinario: _____

Aparato Genital: _____

Sistema musculo esquelético: _____

PADECIMIENTO ACTUAL:

SINTOMAS GENERALES: _____

EXPLORACIÓN FÍSICA:

HABITUS EXTERIOR: _____

SIGNOS VITALES

TA _____, FC _____, FR _____, T° _____

SOMATOMETRIA

PESO: _____, TALLA: _____, IMC: _____, %GC: _____

RELACION CINTURA-CADERA : _____ .

EXPLORACION POR APARATOS Y SISTEMAS:

CABEZA: _____

CUELLO: _____

TORAX: _____

ABDOMEN: _____

EXTREMIDADES: _____

TRATAMIENTO ACTUAL

RESULTADOS DE LABORATORIO.

PLAN:

FECHA Y HORA DE ELABORACION.

ELABORO: _____.

