

Modificaciones de las lipoproteínas de baja densidad en pacientes diabéticos

Modification of low-density lipoproteins in diabetic patients

► Catalina Beatriz De Marco^{1* **}, Adriana Elena Scoccia^{2*},
María Carmen Apezteguía^{3***}, Liliana Bruzzone^{4****}, Susana Beatriz Etcheverry^{5*}

1. Magíster en Ciencias del Laboratorio Clínico.
2. Lic. en Bioquímica y Farmacia.
3. Licenciada en Matemática Aplicada.
4. Doctora en Química.
5. Dra. en Ciencias Bioquímicas.

* Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 47 y 115. 1900 La Plata.

** Hospital Interzonal de Agudos General San Martín, La Plata. Avenida 1 esq. 70. 1900 La Plata.

*** Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 47 y 115. 1900 La Plata.

**** Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 47 y 115. 1900 La Plata.

Resumen

En los pacientes diabéticos, las lipoproteínas presentan frecuentemente cambios cualitativos y cuantitativos en su composición y varios pasos del metabolismo están alterados. Estas anomalías contribuyen al incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular y se la conoce como "dislipemia aterogénica". En este trabajo se estudiaron en una población de pacientes diabéticos las modificaciones fisicoquímicas por glicación de sus lipoproteínas de baja densidad (LDL), los resultados se compararon con una población control y con ensayos de glicación *in vitro*. Las LDL se aislaron por precipitación selectiva y las modificaciones se evaluaron por el incremento de fructosamina, el consumo de los residuos ϵ -amino de lisina, guanidinio de arginina y la disminución de la fluorescencia del grupo indol del triptofano. Los procedimientos seleccionados resultan accesibles al laboratorio clínico. Los valores medios para todos los analitos medidos fueron significativamente diferentes de los de la población control ($p < 0,0001$); de la comparación del ensayo *in vitro* pudo deducirse que las alteraciones de los residuos de arginina serían un marcador temprano de las modificaciones por glicación, en tanto que las producidas en los residuos de lisina y triptofano representarían indicadores de las alteraciones de mediano plazo. Vale considerar la utilidad de evaluar simultáneamente en una misma molécula, indicadores de control glucémico tanto de corto como de mediano plazo, teniendo en cuenta su relevancia en la fisiopatología de la aterosclerosis.

Palabras clave: aterogénesis * diabetes *mellitus* * lipoproteínas de baja densidad * glicación * precipitación selectiva

Summary

In diabetic patients, lipoproteins usually show qualitative and quantitative changes in their composition and as a consequence, several metabolic pathways are altered. These alterations contribute to an increase in the risk of cardiovascular disease, also known as "atherogenic dyslipidemia". The present work studied the physicochemical modifications by glycation of low density lipoproteins (LDL) in a population of diabetic patients. The results were compared with a control population and with the results obtained from an in vitro glycation assay. LDL were isolated by selective precipitation and the modifications were assessed by the increase in fructosamine level, the decrease of ϵ -amino group of lysine, guanidinio of arginine and indol fluorescence of tryptophan residues. The select

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Acta Bioquím Clín Latinoam 2009; 43 (4): 579-87

methods are available for clinical laboratories. The mean values for all the measured analytes were significantly different from those obtained for the control population ($p < 0.0001$). Taking into account the results of the *in vitro* kinetics assays, it can be assumed that the modifications of the arginine residues would be an early glycation marker while the changes in the lysine and tryptophan residues may be considered middle term alterations. It is worth remarking the usefulness of evaluating, early and middle term indicators of glycaemic control simultaneously in the same molecule. These findings are relevant for the pathophysiology of atherogenesis.

Key words: atherogenesis * diabetes mellitus * low density lipoproteins * glycation * selective precipitation

Introducción

La diabetes *mellitus* con sus manifestaciones crónicas constituye un grave problema para la salud pública ya que compromete la calidad y expectativa de vida de quien la padece y se encuentra entre las primeras causas de muerte en distintos países, especialmente por enfermedad renal terminal y enfermedad cardiovascular.

La evidencia científica en la actualidad considera a la hiperglucemia como un factor causal grave en el desarrollo de las complicaciones vasculares diabéticas pudiendo producir sus efectos nocivos por múltiples vías. Este hecho fue claramente confirmado por el estudio *Diabetes Control and Complications Trial* para la microangiopatía en el caso de la diabetes tipo I y corroborado por el *United Kingdom Prospective Diabetes Study* para el caso de diabetes tipo II (1) (2). Sin embargo, los mecanismos patogénicos son varios y se encuentran íntimamente relacionados. La glicación no enzimática de las proteínas, el estrés oxidativo y las alteraciones de las vías metabólicas presentes en la diabetes *mellitus* forman una tríada donde sus elementos actúan simultáneamente, potenciándose unos con otros. Este proceso se denomina en conjunto glicoxidación (3). En particular, la glicoxidación de las LDL produce en ellas modificaciones fisicoquímicas y alteraciones del metabolismo que involucran no sólo la porción proteica sino, además, al componente fosfolipídico (4) (5).

Es importante destacar que los dos procesos mencionados, el de oxidación lipídica y el de la glicación no enzimática, conducen a modificaciones similares de los grupos amino de las proteínas y en ambos están involucrados productos intermedios similares (6). El paso final común sería el daño de las macromoléculas por las especies carbonílicas generadas, hecho que podría explicar el desarrollo de las complicaciones secundarias de la diabetes (7).

Entre los efectos provocados en la fracción proteica se encuentra un aumento en la fructosamina (8) (9) y modificación de los residuos de lisina, arginina y triptofano (10-13); además, se altera la interacción de las LDL con su receptor (Apo B 100/E) y por lo tanto su aclaramiento, pudiendo contribuir así a elevar los niveles de LDL en pacientes con diabetes (4). Estas LDL modificadas son tomadas por los macrófagos a través de receptores *scavenger* y mediante otros mecanismos aún no dilucidados. Su transformación en células espumosas constituye una etapa relevante en la iniciación de la lesión aterosclerótica (14-19).

Con el propósito de destacar, desde el punto de vista clínico, el papel que desempeña la glicación de las LDL, especialmente en una enfermedad con características de

pandemia como lo es la diabetes *mellitus*, en este trabajo se estudian las principales modificaciones de las LDL en pacientes diabéticos. Esta propuesta se basó en ensayos previos *in vitro* que avalaron los procedimientos seleccionados accesibles al laboratorio clínico (20).

Las alteraciones bioquímicas se investigan sobre la base de los principales grupos modificados en la glicación, como lo son los residuos ϵ -amino de lisina y guanidinio de arginina, y se incorpora, además, la determinación de un aminoácido no frecuentemente investigado como el triptofano, del que se sabe que modifica su fluorescencia por cambios producidos en su entorno (21).

La expectativa de este trabajo es seleccionar biomarcadores útiles para la determinación del riesgo aterogénico que complementen en la evaluación del paciente diabético utilizando una metodología accesible para los laboratorios de análisis clínicos, previamente informada por estos autores, tanto para el fraccionamiento de las lipoproteínas plasmáticas como así también para la determinación de las modificaciones en la fracción LDL (20).

Materiales y Métodos

- Ácido etilen-diaminotetracético sal sódica (EDTA) (Laboratorios Anhedra, Argentina)
- Ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) (Sigma Chemical Co, EE.UU.)
- Azul de nitro tetrazolio (NBT) (Sigma Chemical Co, EE.UU.)
- Citrato de sodio (Mallinckrodt Chemical Works, EE.UU.)
- Colestat enzimático (Laboratorios Wiener, Argentina)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Co, EE.UU.)
- Glicemia enzimática (Laboratorios Wiener, Argentina)
- Heparina sódica (50.000 U/L) (Laboratorios Northia, Argentina)
- L-lisina (Sigma Chemical Co, EE.UU.)
- L-arginina (Sigma Chemical Co, EE.UU.)
- L-triptofano (Sigma Chemical Co, EE.UU.)
- Placas de inmunodifusión radial para apo B (Biocientífica S.A., Argentina)
- TG Color (Laboratorios Wiener, Argentina)
- Otras drogas y reactivos de fuente comercial y grado analítico

Métodos

POBLACIÓN

Se seleccionaron 50 pacientes diabéticos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 65 años que asistían al Servicio de Nutrición y Endocrinología del Hospital Interzonal General de Agudos San Martín de La Plata y que concurrían al Laboratorio Central para sus controles periódicos de glucemia y perfil lipídico.

Como población control se seleccionaron 50 sujetos de ambos sexos con edades comprendidas entre 20 y 60 años y que concurrían al Laboratorio Central para la realización del estudio prenupcial, cumpliendo con las condiciones de ayuno y de no tener enfermedad aparente, con niveles deseables de colesterol total, HDL y triglicéridos dentro del intervalo de referencia según los criterios del *Adult Treatment Panel III* (22).

Esta propuesta fue avalada por el Comité de Bioética del Servicio de Docencia e Investigación del mencionado hospital, para lo cual se aprobó un modelo de consentimiento informado.

MUESTRAS

Las muestras fueron obtenidas por punción venosa después de un ayuno de 12 horas y el suero fue separado del paquete globular en un período no superior a las 2 horas.

PROCEDIMIENTO

En cada muestra fueron realizadas las determinaciones séricas de glucosa (equipo enzimático conteniendo glucosa oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona y fenol), triglicéridos (equipo enzimático conteniendo lipoproteína lipasa, glicerol quinasa, glicerolfosfato oxidasa, peroxidasa, adenosina trifosfato y 4-aminofenazona), colesterol total (equipo enzimático conteniendo lipasa, colesterol oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona, fenol), HDL colesterol (equipo enzimático que utiliza como reactivo precipitante ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio, procediéndose luego a la determinación de colesterol en el sobrenadante según el método ya descrito). En todos los casos se procedió de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por otra parte, la determinación de fructosamina se realizó por el procedimiento descrito en detalle más adelante.

Se conservaron alícuotas a 4° C para la precipitación selectiva de las LDL dentro de las 4 horas.

Aislamiento de las LDL por precipitación selectiva

El reactivo precipitante contiene citrato de sodio 64 mmol/L y heparina sódica 50.000 U/L, pH 5,12. Se precipitaron las LDL adicionando 1 mL de reactivo a 1 mL de suero. Se mezcló e incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 15 min a 3.000 rpm y se procedió a lavar el precipitado una vez con solución fisiológica (NaCl 9 g/L). Se resuspendieron las LDL con 1 mL de solución de NaCl 5% en *buffer* fosfato 0,05 M, pH 7,2 (20).

En el día del fraccionamiento de las LDL se efectuaron las determinaciones de proteínas, lisina, arginina, fructosamina, colesterol y triglicéridos. Además, una alícuota se conservó a -20°C para la determinación de ApoB y otra fue suplementada

con EDTA (concentración final 1 mM) para la cuantificación de triptofano.

Determinación de proteínas totales

Se cuantificó el contenido proteico en la fracción de las LDL mediante un método colorimétrico (23). El mismo utiliza la propiedad de las proteínas de unirse al colorante azul brillante de Coomassie G-250, dando un complejo con máximo de absorción a 595 nm. Este compuesto presenta un alto coeficiente de extinción otorgando al ensayo una elevada sensibilidad.

Reactivo: azul brillante de Coomassie G-250 al 0,01% (p/v) en etanol al 95% y ácido fosfórico 8,5% (p/v).

Procedimiento: se dispensaron 10 µL de la solución proteica en 2 mL de reactivo, se mezcló y determinó la absorbancia a 595 nm entre 1 minuto y 1 hora. Las mediciones se efectuaron por triplicado. La concentración proteica se calculó a partir de una curva de calibración, empleando un estándar de seroalbúmina bovina, en un rango de concentración comprendido entre 1 a 10 µg /10 µL. La ecuación obtenida fue:

$$y = 61,24 x - 1,35 \quad r^2 = 0,9953$$

donde y es la concentración proteica expresada en µg/ 10 µL y x la absorbancia a 595 nm.

Determinación de lisina

Los grupos ε-aminos de lisina en la fracción LDL fueron estimados usando el ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS), el cual se une a aminas primarias y péptidos para dar trinitrofenil derivados (24). Se realizó el barrido espectrofotométrico entre $\lambda = 320$ nm y $\lambda = 450$ nm y se observó que las soluciones acuosas de lisina y las soluciones de LDL, luego de la reacción con TNBS, presentaban su máxima absorción en 340 y 346 nm, respectivamente. Este resultado valida el uso de la determinación para aminas primarias libres, en este caso los grupos ε-amino de lisina, ya que el grupo α-amino de los aminoácidos está participando en la unión peptídica.

Reactivo: ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico (TNBS) al 0,1% en agua destilada, bicarbonato de sodio al 4% pH 8,4 y ácido clorhídrico 1N.

Procedimiento: se utilizaron 100 µL de las LDL aisladas y se adicionaron sucesivamente 1 mL de NaHCO₃ y 100 µL de TNBS. Se mezcló e incubó durante una hora a 37 °C. Se adicionó 1 mL de HCl, y se procedió a la lectura de las absorbancias a 340 nm. Las determinaciones se efectuaron por triplicado y el contenido de residuos ε-amino de lisina en las LDL se calculó mediante una curva de calibración partiendo de una solución madre de lisina 2 mM. La ecuación resultante fue:

$$y = 0,287 x - 0,007 \quad r^2 = 0,9867$$

donde y es la concentración de lisina expresada en µmoles/100 µL y x la absorbancia a 340 nm. El coeficiente de variación intraensayo (CV%) fue de 8% para 20 repeticiones. Los resultados finales se expresaron en forma relativa al contenido proteico en nmoles de lisina/mg de proteína.

Determinación de arginina

Se cuantificó el contenido de arginina en la fracción LDL mediante un método espectrofotométrico (25). El mismo se basa en la formación de especies coloreadas al reaccionar el

grupo guanidinio con timol e hipobromito de sodio en medio alcalino. Se realizó el barrido espectrofotométrico entre $\lambda = 380$ nm y $\lambda = 540$ nm y se observó que las soluciones acuosas de arginina libre y las soluciones de LDL, luego de la reacción con hipobromito, tenían sus picos de absorbancias coincidentes, lo que valida el uso de la determinación del grupo guanidinio en la solución proteica de las LDL como marcador de residuos de arginina con grupo guanidinio libre.

Reactivo: solución acuosa de timol (2-propil 5-metil fenol) al 0,02% en NaOH 0,01N, e NaBrO (2%: 0,68 mL de Br₂ en 100 mL de NaOH 5%).

Procedimiento: se utilizaron 50 μ L de las LDL aisladas, a los que se adicionaron sucesivamente 530 μ L de agua destilada, 400 μ L de la solución de timol y 20 μ L de NaBrO. Después de mezclar se procedió a determinar la absorbancia a 440 nm. Las determinaciones se efectuaron por triplicado y el contenido de arginina se calculó a partir de una curva de calibración. La misma fue obtenida partiendo de una solución madre de arginina al 1% (p/v) en cloruro de sodio al 5%. La ecuación resultante fue:

$$y = 0,146 x - 0,001 \quad r^2 = 0,9929$$

donde *y* es la concentración de arginina expresada en μ moles/50 μ L, y *x* la absorbancia a 440 nm. El coeficiente de variación intraensayo CV% fue de 3% para 20 repeticiones. Los resultados finales se expresaron en forma relativa al contenido proteico en nmoles de arginina/mg de proteína.

Determinación de triptofano

Se cuantificó el contenido de triptofano en las LDL por la emisión de fluorescencia, resultante de la rotación del grupo indol entre las uniones peptídicas (21). Se utilizó un espectrofluorómetro Aminco-Bowman SPF 100 (Silver Spring, Maryland, EE.UU.) empleando una λ de excitación de 280 nm y λ de emisión de 335 nm (10). Se utilizó un patrón de quinina en ácido sulfúrico (1 μ g/mL) para calibrar y monitorear el funcionamiento de la lámpara. Se tomaron 200 μ L de las LDL llevando a un volumen final de 1 mL con *buffer* PBS, usando como estándar una solución de triptofano 1 mM. El coeficiente de variación intraensayo CV% fue de 0,15% para 9 repeticiones. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y los resultados finales se expresaron en forma relativa al contenido proteico en nmoles de triptofano/mg de proteína.

Determinación de fructosamina

La fructosamina se forma por enlace covalente entre los grupos amino libres de las proteínas (principalmente ϵ -amino de lisina) con el grupo carbonilo de los azúcares reductores. Es una reacción reversible, que en el estado estacionario alcanza su concentración de equilibrio. Esto depende *in vivo* de la concentración de glucosa promedio y de la vida media de la proteína considerada.

Se utilizó el método de la fructosamina para caracterizar los productos de glicación tempranos sobre las proteínas (26). El mismo se basa en la propiedad del grupo cetoamino de las proteínas glicadas de reducir al colorante azul de nitro-tetrazolio (NBT) induciendo la formación de un producto rojo con máximo de absorbancia a 530 nm.

Reactivo: solución de azul de nitro-tetrazolio 0,25 mM en *buffer* carbonato de sodio 0,1 M, pH 10,8.

Procedimiento: a 1 mL de reactivo se le adicionaron 150 μ L de las LDL aisladas. El volumen de LDL empleado es una adaptación del método para la determinación de fructosamina sérica (50 μ L). Para esta experiencia se consideraron los trabajos publicados por Press, *et al.* (27), y Wikinski, *et al.* (8). Se incubó a 37 °C, registrándose la absorbancia a 530 nm a los 10 y 15 minutos de incubación. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y la concentración de fructosamina se calculó a partir de las diferencias de absorbancias mediante una curva de calibración. Para tal fin se empleó un estándar de desoximorfolinofructosa de concentración 3,6 mmol/L. La ecuación resultante fue:

$$y = 63,4 x + 0,454 \quad r^2 = 0,9960$$

donde *y* es la concentración de fructosamina expresada en mmol/L y *x* es la diferencia de absorbancias a 530 nm. El coeficiente de variación intraensayo (CV%) fue de 4% para 20 repeticiones. El resultado final se expresó en forma relativa al contenido proteico en nmoles de fructosamina/mg de proteína.

Determinación de apoB

La apolipoproteína B es el componente proteico de la fracción de las LDL. Para su determinación en la fracción LDL se emplearon placas de inmunodifusión radial (Diffu-Plate Biocientífica S.A.). Se procedió según las instrucciones del fabricante. El rango de concentraciones empleado fue de 18,5 a 234,6 mg/dL. Se utilizó un suero control de concentración de Apo B de 71 mg/dL. El coeficiente de variación intraensayo (CV%) fue 2,7% para 10 repeticiones.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron en cada caso como la media \pm SEM de los replicados.

En el estudio de pacientes y controles se utilizó el *test t* de Student para la comparación de medias de los analitos medidos, y la prueba chi-cuadrado (χ^2) para el análisis de proporciones de las variables no numéricas.

Resultados

MODIFICACIONES FÍSICOQUÍMICAS DE LDL DE PACIENTES DIABÉTICOS AISLADAS POR PRECIPITACIÓN SELECTIVA.

Se estudió un total de 50 individuos diabéticos y 50 individuos controles.

La Tabla I muestra las características demográficas y bioquímicas de ambos grupos.

Dentro de la población de pacientes diabéticos, 19 fueron diabéticos tipo I, 30 diabéticos tipo II y una paciente presentó diabetes gestacional. La Tabla II muestra características recopiladas de las historias clínicas de esos pacientes: índice de masa corporal (IMC), duración de la enfermedad, hipertensión arterial y el valor de hemoglobina glicosilada (HbA1C). Las siguientes patologías fueron consideradas como complicaciones crónicas asociadas a la diabetes: la retinopatía, neuropatía, ne-

Tabla I. Características demográficas y bioquímicas de la población diabética y control.

	Diabéticos	Controles	p valor
Número de individuos	50	50	
Edad promedio(años)*	47	33	<0,0001*
Sexo(masc/fem)	25/25	25/25	1,000
Glucosa en ayunas (g/L) #	1,76 ± 0,13	0,88 ± 0,01	<0,0001*
Colesterol total (g/L) #	2,07 ± 0,06	1,78 ± 0,04	<0,0001*
HDL colesterol (g/L) #	0,45 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,039*
Triglicéridos (g/L) #	1,68 ± 0,14	1,14 ± 0,05	<0,0001*
Fructosamina sérica (mmol/L) #	4,82 ± 0,11	2,26 ± 0,03	<0,0001*

Los valores representan la media ± SEM (test de Student); * Diferencias significativas

fropatía, enfermedad cardíaca coronaria y enfermedad vascular periférica. Además, se adjuntaron los resultados correspondientes a las determinaciones de glucosas en ayunas, colesterol total, HDL colesterol, triglicéridos y fructosamina sérica.

Se observa que la frecuencia de la presencia de hipertensión arterial resultó significativamente mayor en los diabéticos tipo II. Con relación a las complicaciones crónicas, las diferencias de frecuencias entre grupos no resultaron estadísticamente significativas, aunque en el caso de la retinopatía el p valor se halló próximo al seleccionado como crítico. Con respecto a los parámetros bioquímicos estudiados se encontró diferencia significativa entre los grupos para la HbA1c y la fructosamina sérica.

En ambos casos los resultados fueron mayores en los diabéticos tipo I.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO EN LA FRACCIÓN LDL.

En la tabla III se muestran los valores correspondientes a la caracterización bioquímica de LDL aislada por precipitación selectiva de población de pacientes diabéticos y controles.

Los valores hallados para los residuos de lisina, arginina, triptófano y de fructosamina en la fracción LDL en pacientes diabéticos y controles se muestran en la Tabla IV. Los mismos se expresaron en forma relativa al contenido proteico.

Estos resultados se representaron mediante el sistema de caja y líneas. Como puede verse en las Figs.1-4, los puntos medios de las distribuciones para los analitos estudiados son distintos.

Tabla II. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de pacientes diabéticos tipo I y II.

	Pacientes tipo I	Diabéticos tipo II	p valor
Número de individuos	19	30	-
Edad promedio (años) *	38	54	<0,001*
Sexo (masc/fem)	12/7	13/17	0,176
IMC (Kg/m ²) #	26,2 ± 1,22	28,4 ± 0,61	0,077
Duración de diabetes (años)	12	5	0,002*
Hipertensión arterial (presente/ausente) †	6/13	19/11	0,030*
Retinopatía (presente/ausente) †	9/10	7/23	0,080
Neuropatía(presente/ausente) †	3/16	5/25	0,935
Nefropatía (presente/ausente) †	4/15	4/26	0,476
Enf. cardíaca coronaria (presente/ausente) †	4/15	11/19	0,248
Enf. vascular periférica (presente/ausente) †	4/15	7/23	0,852
Glucosa en ayunas (g/L) #	2,03 ± 0,27	1,60 ± 0,12	0,156
Colesterol total (g/L) #	2,05 ± 0,09	2,07 ± 0,08	0,868
HDL Colesterol (g/L) #	0,46 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,517
Triglicéridos (g/L) #	1,57 ± 0,26	1,76 ± 0,16	0,505
Fructosamina sérica (mmol/L) #	5,20 ± 0,22	4,60 ± 0,11	0,019*
HbA1c (%) #	9,70 ± 0,41	8,61 ± 0,34	0,048*

Los valores representan la media ± SEM (test de Student); † (chi-cuadrado); * Diferencias significativas

Tabla III. Caracterización bioquímica de LDL aislada por precipitación selectiva de población de pacientes diabéticos y controles. #

	Diabéticos	Controles	p valor
Colesterol total (g/L)	1,12 ± 0,04	1,07 ± 0,04	0,328
Triglicéridos (g/L)	0,86 ± 0,06	0,72 ± 0,04	0,078
Proteínas (mg/dl)	181,98 ± 4,13	163,16 ± 3,11	<0,0001*
ApoB (mg/dl)	143,94 ± 3,37	141,20 ± 3,21	0,557

Los valores representan la media ± SEM (test de Student); *Diferencias significativas

Tabla IV. Lisina, arginina, triptofano y fructosamina en LDL aislada por precipitación selectiva en pacientes diabéticos y controles.

	Diabéticos	Controles	p valor
Lisina (nmoles/mg proteína)	265,30 ± 6,26	866,98± 18,30	<0,0001*
Arginina (nmoles/mg proteína)	149,24 ± 3,95	411,48± 12,81	<0,0001*
Triptofano (nmoles/mg proteína)	68,88 ± 1,21	110,06 ± 1,59	<0,0001*
Fructosamina(nmoles/mg proteína)	715,30 ± 12,16	357,52 ± 5,11	<0,0001*

Los valores representan la media ± SEM (test de Student); *Diferencias significativas

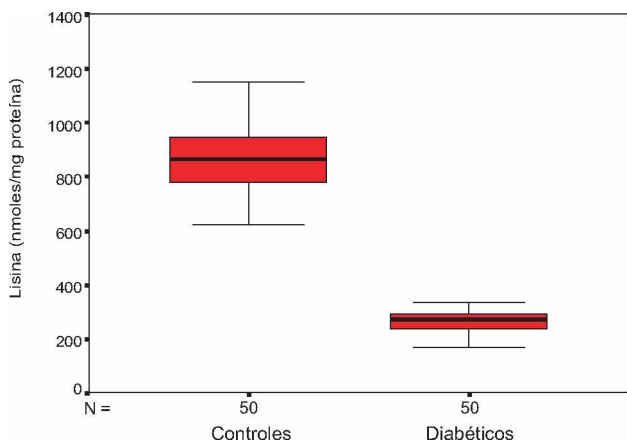


Figura 1. Gráfica de caja para la determinación de lisina en la LDL aislada de una población de pacientes diabéticos y controles.

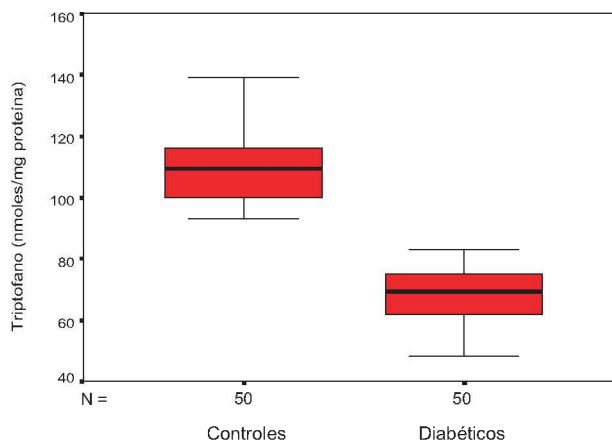


Figura 3. Gráfica de caja para la determinación de triptofano en la LDL aislada de una población de pacientes diabéticos y controles.

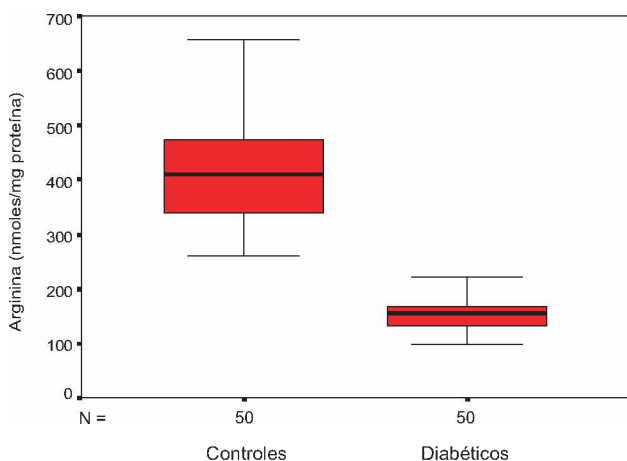


Figura 2. Gráfica de caja para la determinación de arginina en la LDL aislada de una población de pacientes diabéticos y controles.

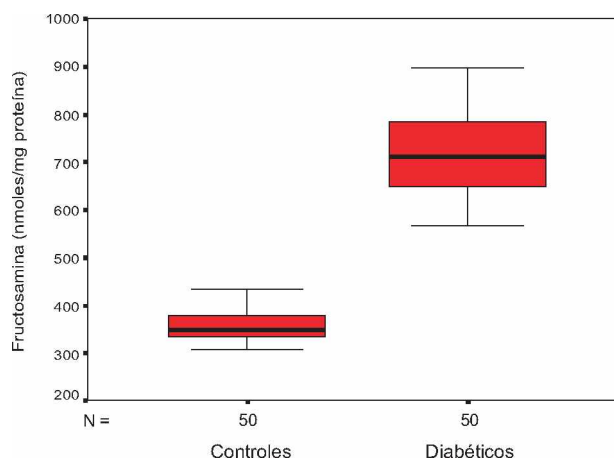


Figura 4. Gráfica de caja para la determinación de fructosamina en la LDL aislada de una población de pacientes diabéticos y controles.

También se compararon las medias de lisina, arginina, triptofano y fructosamina en la fracción LDL entre los pacientes diabéticos tipo I y tipo II. Estos resultados se muestran en la tabla V.

COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DEL ENSAYO DE GLICACIÓN IN VITRO DE LAS LDL CON LOS RESULTADOS DE PACIENTES DIABÉTICOS

Con el propósito de interpretar los resultados obtenidos de cada uno de los analitos medidos en las muestras de los pa-

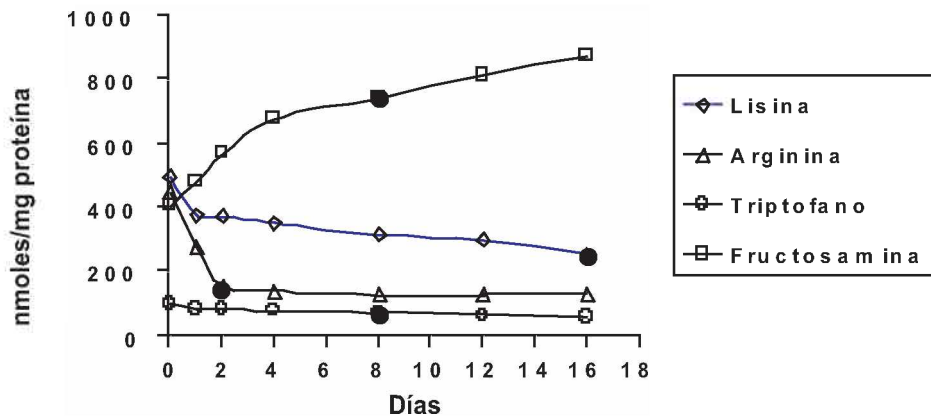
cientes diabéticos, se compararon los valores medios con los correspondientes a un ensayo cinético de glicación *in vitro* de las LDL, publicado previamente por estos autores (20).

Como puede observarse en la Fig. 5 el valor medio para lisina estuvo próximo al día 16 de incubación de las LDL con glucosa 200 mM. Para arginina el mismo se encontró próximo al día 2, en tanto que para triptofano y fructosamina, los mismos se hallaron próximos al día 8.

Tabla V. Lisina, arginina, triptofano y fructosamina en LDL aislada por precipitación selectiva en pacientes diabéticos tipo I y tipo II.

	Pacientes tipo I	Diabéticos tipo II	p valor
Número de pacientes	19	30	-
Lisina (nmoles/mg proteína)	254,00 ± 9,83	270,87 ± 8,12	0,196
Arginina (nmoles/mg proteína)	138,47 ± 6,23	155,17 ± 4,91	0,040*
Triptofano (nmoles/mg proteína)	66,42 ± 2,08	70,40 ± 1,49	0,117
Fructosamina(nmoles/mg proteína)	704,37 ± 19,58	722,80 ± 16,15	0,475

Los valores representan la media ± SEM (test de Student), *Diferencias significativas



- Inserción de los valores medios de los analitos medidos en las LDL de los pacientes diabéticos en las curvas obtenidas en el ensayo *in vitro*.

Figura 5. Inserción de los valores medios (●) de los analitos medidos en las LDL de los pacientes diabéticos en las curvas de cinética de glicación *in vitro* con glucosa 200 mM.

Discusión y Conclusiones

Si bien las modificaciones de las LDL en pacientes diabéticos han sido documentadas extensamente por varios grupos de trabajo (28-32), en este trabajo de investigación se empleó por primera vez un método de precipitación selectiva de las LDL y la determinación de los marcadores de modificación de las mismas por glicación mediante métodos sencillos al alcance del laboratorio clínico, teniendo en cuenta razones de simplicidad, eliminación de instrumental costoso y rapidez en los resultados.

Los resultados obtenidos en la población de pacientes diabéticos mostraron para todos los analitos medidos diferencias altamente significativas con respecto a la población control.

Cabe mencionar que para dejar establecido un intervalo de referencia para los analitos determinados en el caso de la población control, deberían evaluarse un mínimo de 120 especímenes de acuerdo a la norma C28-A del *National Committee of Clinical Laboratory Standards* (33), en consecuencia queda abierta esta consideración para ensayos futuros.

Por otro lado, de la comparación de los valores medios de los pacientes con aquellos obtenidos del ensayo cinético de glicación *in vitro*, se infiere que las modificaciones de los residuos de arginina serían las primeras en detectarse en el tiempo, y por lo tanto, podrían interpretarse como un biomarcador temprano del control glucémico. Este aminoácido presenta una mayor velocidad de modificación en función de su concentra-

ción en la molécula de LDL (10); además, es sabido que en los pacientes diabéticos existen niveles elevados de oxalaldehídos y que la actividad glicante de los mismos está principalmente dirigida a los residuos de arginina (11) (34)(35).

Efectuando el mismo análisis comparativo para los valores de lisina y fructosamina que comparten un mismo camino metabólico en la reacción de Maillard, podría considerarse que los mismos representarían indicadores del control glucémico de mediano plazo. La estimación de los grupos amino libres en las proteínas, representados principalmente por los grupos ε-amino de lisina a través del ensayo del ácido trinitrobenzeno-sulfónico, ya fue informada por otros autores quienes la han interpretado como valoración del grado de glicación y glicosilación (36)(37). Además, Sanguinetti, *et al.* también demostraron que el ensayo de la fructosamina en la fracción LDL puede proveer información útil sobre el grado de glicación lipoproteica (8). Estas evidencias respaldan los procedimientos empleados en esta investigación. Otros investigadores encontraron correlación significativa entre los valores hallados para LDL glicada (obtenida por enzoinmunoensayo) con fructosamina sérica y glucemia en pacientes diabéticos y sugieren su potencial utilidad como otro índice de control de mediano plazo (31).

En relación al triptofano, este aminoácido fue estudiado, ya que si bien es sabido que se producen modificaciones en la emisión de fluorescencia atribuibles principalmente a los cambios del entorno del indol, no se dispone de datos previos en

la literatura referidos a pacientes diabéticos. El valor promedio encontrado en la población de pacientes diabéticos estudiada se asemeja al valor del octavo día de incubación con glucosa 200 mM y tal vez podría interpretarse como indicador de mediano plazo del control glucémico.

De lo expuesto, vale considerar la utilidad de evaluar simultáneamente en una misma molécula, indicadores del control glucémico tanto de corto como de mediano plazo, teniendo en cuenta, además, la relevancia de las modificaciones de las LDL en la fisiopatología de la aterosclerosis.

Por otro lado, no se encontró correlación entre el grado de las modificaciones en los analitos estudiados en las LDL de los pacientes diabéticos con la presencia o ausencia de cada una de las complicaciones crónicas informadas en las historias clínicas de los mismos. Esas complicaciones crónicas, que son procesos patogénicos complejos, están mediadas por una combinación de alteraciones bioquímicas que incluyen la hiperglucemia, anormalidades cualitativas y cuantitativas de las lipoproteínas, estrés carbonílico y reacciones oxidativas entre otras. Por ello, actualmente los mecanismos fisiopatológicos son aún motivo de debate e investigación en el área de la diabetes *mellitus*. Así, con relación a los resultados obtenidos en esta experiencia, en pacientes diabéticos, sería necesaria la evaluación de un número mayor de pacientes o tal vez el seguimiento de los mismos en el tiempo para poder emitir conclusiones válidas al respecto.

Finalmente, con los conocimientos preexistentes en relación al diagnóstico y seguimiento de la diabetes *mellitus* y con la comprensión del rol de la glicoxidación de las lipoproteínas en el desarrollo del daño vascular, los resultados de esta investigación permitirían extender al laboratorio clínico, a través de mediciones sencillas, la evaluación del grado en que las LDL se encuentran glicadas y modificadas, aportando un dato útil que complementa la evaluación global del paciente diabético.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Norberto Cédola, del Servicio de Nutrición y Endocrinología del Hospital San Martín de La Plata por su asesoramiento en la recopilación de los datos de las historias clínicas de los pacientes diabéticos y a la Dra. Mercedes Laporte del Laboratorio Central del Hospital San Martín de La Plata por avalar esta propuesta.

MCA es miembro de la Carrera de Personal de Apoyo a la Investigación Científica de la CICPBA. SBE es miembro de la Carrera del Investigador del CONICET.

Este trabajo ha sido subsidiado por la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP y por la Fundación Ciencias Exactas.

CORRESPONDENCIA

DRA. SUSANA B. ETCHEVERRY
Cátedra de Bioquímica Patológica
Facultad de Ciencias Exactas, UNLP
Calles 47 y 115

1900 LA PLATA, Provincia de Buenos Aires, Argentina
E-mail: etcheverry@biol.unlp.edu.ar

Referencias bibliográficas

1. DCCT (Diabetes Control and Complications Trial Research Group). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
2. UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) 33. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 1998; 352: 837-53.
3. Mc Carthy AD. Glicación, glicoxidación y estrés carbonílico: relevancia en las complicaciones vasculares de la Diabetes *Mellitus*. *Rev Argent Endocrinol Metab* 2000; 37: 141-63.
4. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky Y, Cerami A. Modification of low-density lipoprotein contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9441-5.
5. Actis Dato MS, Rebolledo OR. La glicación y glicoxidación de las lipoproteínas, su importancia en la diabetes *mellitus*. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 645-56.
6. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
7. Lyons TJ, Jenkins AJ. Glycation, oxidation and lipoxidation in the development of the complication of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. *Diabetes Rev* 1997; 5: 365-91.
8. Sanguinetti S, Schreier L, Elbert A, Fasulo V, Ferrari N, Wikinski R. Detection of structural alterations in LDL isolated from type 2 diabetic patients: application of the fructosamina assay to evaluate the extent of LDL glycation. *Atherosclerosis* 1999; 143: 213-5.
9. Mc Carthy AD. Glicosilación no enzimática de proteínas: su rol en las complicaciones crónicas de la diabetes y el envejecimiento. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1995; 2: 173-90.
10. Knott HM, Brown BE, Davies MJ, Deant RT. Glycation and glycoxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3572-82.
11. Thornalley PJ. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1043: 111-7.
12. Gonzalez Flecha FL, Castello FR, Gagliardino JJ, Rossi JPFC. La glicación de las proteínas y su participación en enfermedades humanas. *Ciencia Hoy* 2000; 10: 48-55.
13. Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity T, Vlassara H, Cerami A. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 10828-32.
14. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 1992; 13: 341-90.
15. Mori M, Itabe H, Higashi Y, Fujimoto Y, Shiomi M, Yoshizumi M. Foam cell formation containing lipid droplets enriched with free cholesterol by hyperlipidemic serum. *J Lipid Res* 2001; 42: 1771-81.
16. Martinez-Gonzalez J, Llorente-Cortés V, Badimón L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 218-31.
17. Lam M, Tan K, Lam K. Glycoxidized low density lipoprotein regulates the expression of scavenger receptors in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2004; 177: 313-20.
18. Brown B, Dean R, Davies M. Glycation of low-density lipoproteins by methylglyoxal and glycolaldehyde gives rise to the *in vitro* formation of lipid-laden cells. *Diabetología* 2005; 48: 361-9.
19. Brown B, Mahroof F, Cook N, van Reyk D, Davies M. Hydrazine compounds inhibit glycation of low-density lipoproteins and prevent the *in vitro* formation of model foam cells from glycolaldehyde-modified low-density lipoproteins. *Diabetología* 2006; 49: 775-83.
20. De Marco CB, Scoccia AE, Molinuevo MS, Apezteguía MC, Etcheverry SB. Glicación *in vitro* de lipoproteínas de baja den-

- sidad y aterogenicidad en cultivos celulares. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41: 337-46.
21. Albani JR. New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence: Origen of the fluorescence lifetime and characterization of a new fluorescence parameter in proteins: The emission to excitation ratio. *J Fluoresc* 2007; 17: 406-17.
 22. 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 (ATP III). *JAMA* 2001; 285: 2486-97.
 23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 24248-54.
 24. Habeeb AFSA. Determination of free amino groups in protein by trinitrobenzene sulfonic acid. *Anal Biochem* 1966; 14: 328-36.
 25. Sastry CSP, Tummuru MK. Spectrophotometric determination of arginine in proteins. *Food Chem* 1984; 15: 257-60.
 26. Johnson RN, Metcalf PS, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosyl protein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982; 127: 87-95.
 27. Press RD, Wilding P. Effect of glycation of low-density lipoprotein on the immunological determination of apolipoprotein B. *Clin Chem* 1989; 35: 2219-23.
 28. Brown VW. Lipoprotein disorders in diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 1994; 78: 143-61.
 29. Lopes-Virella MF, Klein RL, Virella G. Modifications of lipoprotein in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1996; 12: 69-90.
 30. Guerci B, Antebi H, Meyer L, Durlach V, Ziegler O, Nicolas JP. Increased ability of LDL from normolipidemic type 2 diabetic women to generate peroxides. *Clin Chem* 1999; 45: 1439-48.
 31. Akanji AO, Abdella N, Mojiminiyi OA. Determinants of glycated LDL levels in nondiabetic and diabetic hyperlipidaemic patients in Kuwait. *Clin Chim Acta* 2002; 317: 171-6.
 32. Scheffer PG, S Teerlink T, Heine RJ. Clinical significance of the physicochemical properties of LDL in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005; 48: 808-16.
 33. National Committee of Clinical Laboratory Standards. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guidelines, NCCLS, Pennsylvania 1995; (Document C28-A).
 34. Mc Lellan AC, Phillips SA, Thornalley PJ. The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Anal Biochem* 1992; 206: 17-23.
 35. Thornalley PJ. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptors recognitions factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol* 1998; 44: 1013-23.
 36. Wang X, Bucala R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7643-7.
 37. Artwohl M, Graier WF, Roden M, Bischof M, Freudenthaler A, Waldhäuse W. Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Diabetes* 2003; 52: 1240-7.

Aceptado para su publicación el 2 de octubre de 2009