

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**EFECTO DE LA GLICINA SOBRE LA
CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN Y LAS
ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

JUANA MARES MANZANARES

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente **Prof. Laura Peniche Villalpando**

Vocal **Prof. Luz del Carmen Castellanos Román**

Secretario **Prof. Margarita Díaz Flores**

1er. Suplente **Prof. Mireya Rodríguez Penagos**

2º. Suplente **Prof. Claudia Huesca Gómez**

Sitio donde se desarrollo el tema:

Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Dra. Margarita Díaz Flores

Nombre completo del sustentante:

Mares Manzanares Juana.

INDICE

Página

1. Introducción.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos particulares	3
1.4 Hipótesis	3
2. Generalidades	4
2.1 Definición y clasificación de la diabetes	4
2.1.1 Diabetes tipo 1	5
2.1.2 Diabetes tipo	7
2.1.3 Factores de riesgo relacionados con diabetes tipo 2	7
2.1.4 Control farmacológico de la diabetes	8
2.1.5 Resistencia a la insulina	10
2.1.6 Diabetes gestacional	12
2.1.7 Otros tipos específicos de diabetes	12
2.2 Fisiopatología de la diabetes	13
2.3 Mecanismos inductores de las complicaciones	15
2.3.1 Glicación	16
2.3.2 Vía del sorbitol	19
2.3.3 Activación de la vía de las hexosaminas	21
2.3.4 Activación de la proteína cinasa C	22
2.3.5 Aumento del estrés oxidativo	24
2.4 Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa	26
2.4.1 Oxidación de la glucosa. Vía de las pentosas fosfato	27
2.4.2 Importancia de la G6PDH	29
2.4.3 Deficiencia de la G6PDH	30
2.5 Gliceraldehído -3- fosfato deshidrogenasa	31

2.5.1 Inhibición de la GAPDH	33
2.6 Glutación	34
2.6.1 Síntesis y regulación del GSH	36
2.7 Glicina	38
2.7.1 Importancia de la glicina	39
2.7.2 Glicina como molécula de comunicación extracelular ..	39
2.7.3 Receptores de la glicina	40
2.7.4 Glicina como antioxidante	40
2.7.5 Glicina como antiinflamatorio	41
2.7.6 Glicina y oxido nítrico	41
2.7.7 Glicina y factores de transcripción	42
2.7.8 Mecanismos de acción de la glicina	43
2.7.9 Glicina y diabetes	44
2.8 El eritrocito	47
2.8.1 Alteraciones del sistema eritrocitario	47
2.8.2 Metabolismo energético de los eritrocitos	49
3. Material y métodos	51
3.1 Productos y reactivos	51
3.2 Aparatos e instrumental	51
3.3 Pacientes	51
3.4 Tratamientos	52
3.5 Preparación de las muestras	52
3.5.1 Determinación de hemoglobina	53
3.5.2 Determinación de la actividad enzimática de G6PDH ...	55
3.5.3 Determinación de la actividad enzimática de GAPDH	56
3.5.4 Determinación de la concentración de GSH	58
3.5.5 Análisis estadístico	60
4. Resultados	61
4.1 Características antropométricas generales	61
5. Discusión	67

6. Conclusiones	70
7. Bibliografía	71

TABLAS

No.		Página
1	Clasificación de la diabetes propuesta por la ADA y la OMS.....	5
2	Factores de riesgo asociados con la diabetes tipo2.....	8
3	Principales fármacos utilizados para control de la hiperglucemia....	9
4	Mecanismos por los cuales la hiperglucemia provoca daño tisular....	15
5	Propiedades fisicoquímicas de la glicina.....	38
6	Clasificación de las alteraciones en los eritrocitos.....	48
7	Enzimopatías hemolíticas.....	48
8	Perfil fisiológico de los pacientes.....	61
9	Perfil bioquímico de los pacientes.....	62

FIGURAS

No.		Página
1	Mecanismos involucrados en la destrucción de la célula β de los islotes pancreáticos durante los procesos de insulinitis.....	6
2	Manifestaciones clínicas y principales anormalidades bioquímicas del síndrome de resistencia a la insulina.....	11
3	Vía del sorbitol.....	20
4	Vía de las hexosaminas.....	22
5	Vía de las pentosas fosfato.....	28
6	Ubicación de la enzima Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa en la vía glucolítica	32
7	Estructura química del glutatión.....	34
8	Relación entre el glutatión y algunas enzimas antioxidantes.....	37
9	Glicación enzimática de proteínas.....	45
10	Mecanismo de protección de la glicina contra la glicación.....	46
11	Relación entre el ciclo del glutatión y las hexosas monofosfato...	49
12	Principales vías glucolíticas en el eritrocito.....	50
13	Curva de calibración de la hemoglobina.....	54
14	Curva estándar del GSH.....	59
15	Actividad de la GAPDH.....	64
16	Actividad de la G6PDH.....	65
17	Contenido de GSH.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Asociación americana de diabetes (siglas en ingles)
AGE	Producto final de glicosilación avanzada (siglas en ingles)
ANOVA	Análisis de varianza
AR	Aldosa reductasa
ASS	Ácido sulfosalícilico
ATP	Adenosina 5' trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
dL	Decilitro
DM	Diabetes mellitus
DS	Desviación estándar
DTMB	5,5'-Litio-bis-(2-ácido nitrobenzoíco)
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ERO	Especie reactiva de oxígeno
G	Gramo
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCS	Glutamilcisteína sintetasa
GFAT	Glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa
GK	Cinasa de la glucógeno sintasa
GS	GSH sintetasa
GSH	Glutati3n
GSSG	Glutati3n oxidado
Hb	Hemoglobina
Hb A1c	Hemoglobina glucosilada
HK	Hexocinasa
IL	Interleucina
INF	Interfer3n
M	Molar

mg	Miligramo
Min	Minutos
μL	Microlitros
mL	Mililitros
mM	Mili molar
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADP+	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
nm	Nanómetro
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintetasa
OGT	Orto-glucosil-N-acetil transferasa
OMS	Organización mundial de la salud
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PARP	Poli(ADP)-ribosa polimerasa
PGK	3-fosfoglicerato cinasa
pH	Potencial de hidrógeno
PKC	Proteína cinasa C
RAGE	Receptor de AGE
RE	Retículo endoplásmico
RPM	Revoluciones por minuto
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SSI	Solución salina isotónica
TEA	Trietanolamina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidades enzimáticas
UI	Unidades internacionales

1. INTRODUCCIÓN

La concentración alta de glucosa de forma crónica, se considera el factor causal clave en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes. Sus efectos ocurren por múltiples vías; destacando la glicación no enzimática de proteínas. Este proceso inicia con la modificación no enzimática de proteínas con carbohidratos fisiológicos *in vivo*. En etapas tempranas e intermedias de la reacción (base de Schiff y productos de Amadori, respectivamente) se producen compuestos α -dicarbonílicos, los cuales son potentes precursores de productos de glicación avanzada (AGE); así como inductores de estrés oxidativo y apoptosis. La interrupción del contacto glucosa-proteína en cualquiera de estas etapas revierte completamente el efecto. Finalmente después de meses incluso años de contacto con la glucosa, las proteínas de bajo recambio dan origen a los AGE; los cuales alteran proteínas intra y extracelulares, e inducen la producción de citocinas y especies reactivas de oxígeno contribuyendo de manera importante al incremento del estrés oxidativo.

Si bien se piensa que la glicación no puede ocurrir en un gran número de enzimas dado que la mayoría de ellas tienen vida media relativamente corta, las bases de Schiff, los compuestos α -dicarbonílicos y el estrés oxidativo pueden alterar significativamente la función biológica de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa así como el contenido de la forma reducida del glutatión, los cuales están significativamente perturbados en la diabetes, ya que sus actividades biológicas son dependientes del estado de oxidación de los grupos tioles y afectan con ello su estructura y funcionalidad. Estas alteraciones tienen consecuencias metabólicas importantes, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa promueve la acumulación de productos de glicación, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y el glutatión reducen la eficiencia de los sistemas antioxidantes si su actividad se ve inhibida.

Una de las estrategias terapéuticas para inhibir la glicación y sus efectos secundarios pudiera ser la administración de glicina, debido a sus propiedades antiinflamatorias, citoprotectoras e inmunomoduladoras. No obstante de contar con un número de trabajos limitados publicados, el efecto protector de la glicina en

el animal diabético es reducir las concentraciones de triglicéridos, colesterol y HbA1c. Así como las alteraciones histológicas presentes en páncreas y membrana basal glomerular, estos resultados sugirieron que la glicina protege de los efectos deletéreos de la glicación no enzimática.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En organismos diabéticos, el principal agente inductor de daño tisular es el estrés oxidativo, que causa alteraciones a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Con la noción de que cuando la actividad de la G6PDH y del GSH se encuentran reducidos, disminuye la capacidad para regenerar el poder reductor y es de esperar que esto repercuta en una variedad de vías metabólicas dependientes de NADPH, dentro de las que se encuentran los sistemas antioxidantes. Estas alteraciones tienen consecuencias metabólicas importantes, en el caso de la GAPDH promueve la acumulación de productos de glicación. Una de las estrategias terapéuticas para inhibir la glicación y sus efectos secundarios pudiera ser la administración de glicina.

JUSTIFICACION

En la actualidad, la diabetes mellitus (DM) plantea un grave problema mundial de salud pública, debido a que ha aumentado su incidencia y prevalencia, en particular, en los países en vías de desarrollo o de reciente industrialización. En México, es una de las enfermedades crónico-degenerativas que se ha colocado paulatinamente, desde los años setenta, dentro de las diez primeras causas de muerte, afectando, en los últimos años 8.2 % de la población mayor de 20 años. Los elevados niveles de glucosa en sangre estimulan la síntesis de productos finales de glicación avanzada e induce estrés oxidativo y ambos factores se sabe que están asociados con el daño a diferentes órganos en los pacientes diabéticos, debido a que la glicina presenta propiedades antioxidantes e inhibe la glicación no enzimática, la ingesta de glicina podría disminuir a largo plazo estas complicaciones.

1.1 OBJETIVOS

1.3.1 *Objetivo general*

Evaluar el efecto de la glicina sobre la concentración del GSH y las actividades de las enzimas G6PDH y GAPDH en eritrocitos de pacientes con diabetes tipo 2.

1.3.2 *Objetivos particulares*

- Obtener muestras sanguíneas de pacientes con diabetes antes y después de someterse a tratamiento con glicina o placebo.
- Determinar las concentraciones de Hb total de cada paciente antes y después de someterse a tratamiento con glicina o con placebo
- Determinar las concentraciones de GSH de cada paciente antes y después de someterse a tratamiento con glicina o con placebo
- Determinar las actividades de las enzimas G6PDH y GAPDH de cada paciente antes y después de someterse a tratamiento con glicina o placebo
- Estudiar los cambios de GSH, G6PDH y GAPDH de cada paciente antes y después de

someterse a tratamiento con glicina o placebo

- Evaluar las pruebas de gabinete clínico de los pacientes y estudiar sus cambios antes y después de someterse a tratamiento con glicina o placebo
- Evaluar el efecto de la glicina sobre los parámetros antes mencionados en los pacientes antes y después de someterse a tratamiento con glicina o placebo.

1.2 HIPOTESIS

La administración de glicina puede disminuir la formación y acumulación de productos de AGEs y sus efectos secundarios mejorando la funcionalidad de los sistemas antioxidantes.

2. GENERALIDADES

2.1 . DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES

En la actualidad no se cuenta con una definición concisa del término diabetes debido a que comprende un grupo de alteraciones metabólicas originados por la interacción entre factores genéticos, inmunológicos y ambientales, así como el estilo de vida. Estos desordenes se caracterizan por niveles elevados de glucosa en sangre. No obstante, de la complejidad de la diabetes, podemos describir las características más relevantes de la enfermedad de la siguiente manera: **“La diabetes se considera una enfermedad sistémica multifactorial, que afecta al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas asociados a la deficiencia en la secreción de insulina, a la resistencia periférica a ésta o a una combinación de ambas”**.

Los nuevos criterios para la clasificación de la diabetes fueron publicados en el año de 1997¹, por un comité de expertos, apoyados por la Asociación Americana de Diabetes, el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales, el Instituto Nacional de la Salud Americano y la Organización Mundial de la Salud²; esta clasificación se basa principalmente en su etiología y características fisiológicas. La clasificación comprende cuatro categorías básicas (Tabla 1) y los siguientes cambios:

- Omisión de los términos diabetes mellitus insulino-dependiente y diabetes mellitus no insulino-dependiente y en su lugar se utilizarán únicamente los términos diabetes tipo 1 y tipo 2, respectivamente.
- Desaparición de las clases de riesgo estadístico: anormalidad previa y potencial tolerancia a la glucosa.
- Se propone un nuevo grupo denominado "otros tipos específicos de diabetes" que engloba a las anteriormente denominadas diabetes secundaria y a las debidas a defectos genéticos consideradas anteriormente dentro de el tipo 2.
- Inclusión dentro del tipo 1 formas de diabetes que involucran destrucción de células β pancreáticas, incluyendo aquellos casos debidos a una causa autoinmune y aquellos en los cuales la etiología se desconoce.

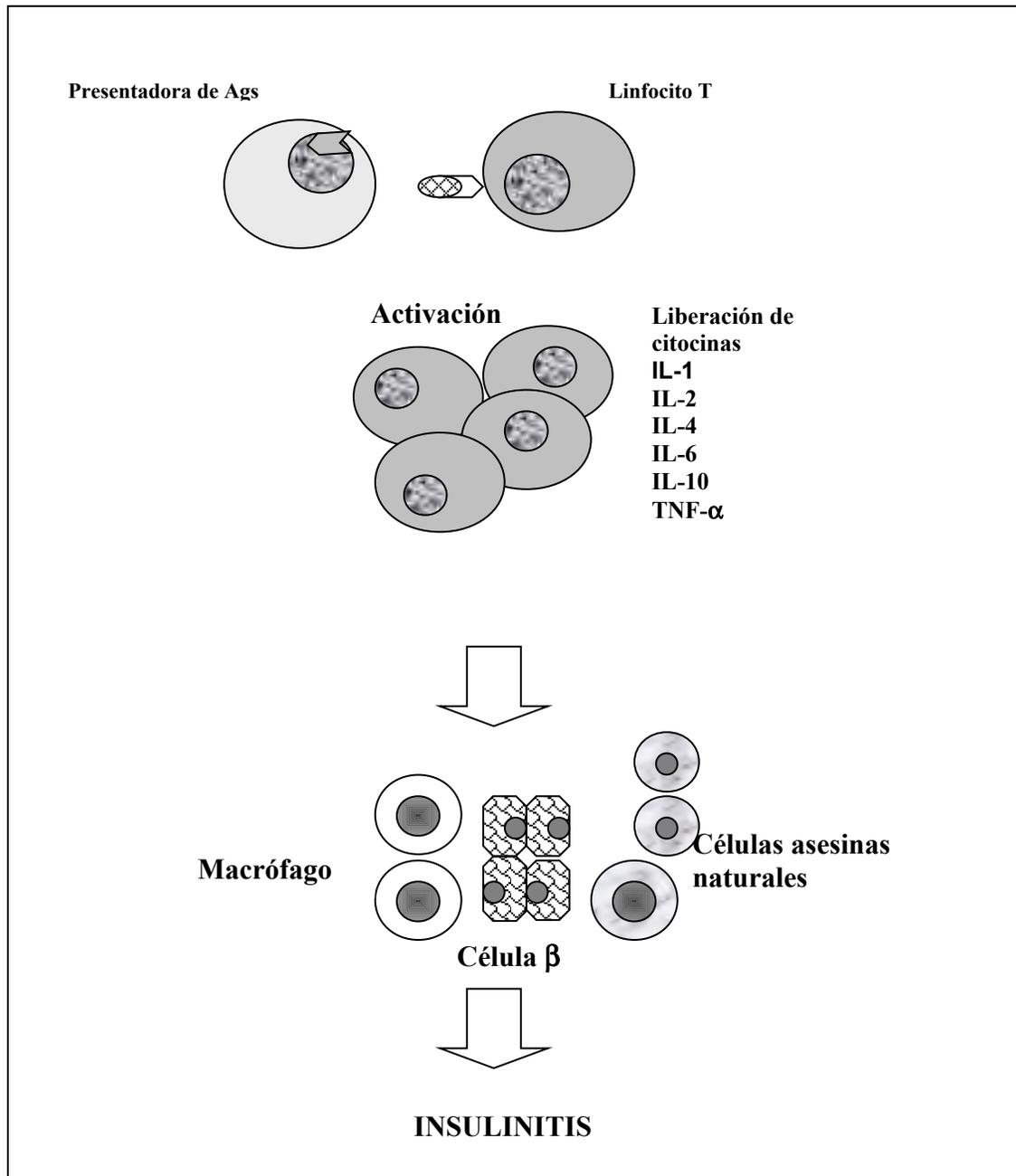
Tabla 1. Clasificación de la diabetes propuesta por la ADA y la OMS²

<ul style="list-style-type: none">▪ Diabetes tipo 1<ul style="list-style-type: none">B. Mediada por inmunidad.C. Idiopática.
Diabetes tipo 2
  Otros tipos específicos de diabetes <ul style="list-style-type: none">A. Defectos genéticos de la función de las células βB. Defectos genéticos en la acción de la insulina.C. Enfermedades del páncreas exocrino.D. Endocrinopatías.E. Inducida por químicos y fármacos.F. Asociada a infeccionesG. Formas poco comunes de diabetes inmuneH. Otros síndromes genéticos asociados a diabetes.
IV. Diabetes gestacional

2 Diabetes tipo 1

Se considera que la diabetes tipo 1 (DT1) es consecuencia de una serie de factores genéticos, ambientales y autoinmunitarios que conducen a la eliminación selectiva de las células β , dando lugar a la disminución total de la secreción de la insulina. Los agentes etiológicos que causan el proceso autoinmune y la destrucción de las células β no están aun establecidos. Sin embargo se conoce que el proceso de destrucción de los islotes pancreáticos, comienza con la infiltración difusa del órgano por linfocitos T (CD8 y CD4) y B, macrófagos y células dendríticas. Esta fase está acompañada de una gran secreción de interleucinas (IL2, IL4, IL6, IL10, IL12), del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y del interferón gamma (del inglés, INF- γ). La liberación de este último compuesto depende, de la acción de una citocina de novo, producida por los macrófagos llamada factor inductor del interferón gamma o IGIF. En conjunto estas citocinas promueven la migración de linfocitos T, CD4 y CD8 activados, linfocitos B y células natural killer hacia los islotes pancreáticos dando origen a una insulinitis³.

Figura 1. Mecanismos involucrados en la destrucción de la célula β de los islotes pancreáticos, durante los procesos de insulinitis.



2.1.2 Diabetes tipo 2

En la diabetes tipo 2 (DT2), la característica central es la resistencia de todos los tejidos periféricos a la acción de la insulina, debido a que se producen alteraciones en la hormona causadas por una combinación de factores genéticos y no genéticos que provocan resistencia a la insulina y/o deficiencia en la secreción de insulina. Los genes específicos no se conocen. Los factores no genéticos incluyen edad avanzada, vida sedentaria, sobrepeso, adiposidad central y bajo peso al nacer. Comprende aproximadamente 90% a 95% de los casos de síndrome diabético. La DT2, a diferencia de la DT1 carece de marcadores genéticos definidos. Se han detectado determinadas alteraciones monogénicas como posible causa de algunos tipos de DT2, si bien en el 98 por ciento de casos la herencia suele tener una base poligénica y multifactorial.

2.1.3 Factores de riesgo relacionados con diabetes tipo 2

En años recientes se han identificado un buen número de factores relacionados con diabetes tipo 2 (Tabla 2). Estos indican la susceptibilidad de la población a desarrollar la enfermedad. Los factores de riesgo no solo se relacionan con la etiología de la enfermedad, sino también se refieren a factores que modifican su presentación o pronóstico. En el caso particular de la diabetes, algunos factores participan en la génesis del padecimiento, siendo la edad uno de los más frecuentes. En cuanto al sexo no se han establecido patrones claros de comportamiento; sin embargo se indica que la enfermedad es un poco más frecuente en mujeres que en hombres. Uno de los factores de riesgo más significativos para el desarrollo de la DT2 es la obesidad. Aproximadamente cerca de dos terceras partes de los diabéticos son obesos al momento del diagnóstico. La distribución de grasa corporal con tendencia a ser central, se considera factor importante más que la obesidad en general. La duración de la obesidad también es una variable de importancia asociada con la diabetes. Por su parte las mujeres con el antecedente de haber tenido un hijo con un peso mayor de cuatro kilos al nacer o de haber padecido diabetes gestacional, tienen riesgo mayor que las mujeres normales de padecer la enfermedad. Otro de los riesgos es la carga genética, la estadística realizada por la Encuesta Nacional de Salud 2000 confirmó

la alta predisposición genética de la población mexicana en el desarrollo de la diabetes⁶.

TABLA 2. Factores de riesgo asociados con diabetes tipo 2

- Familiar de primer grado con diabetes.
- Edad avanzada (mayor a 45 años).
- Peso bajo al nacer (menor a 2500g).
- Mujeres que padecieron diabetes gestacional.
- Índice de masa corporal elevado (mayor o igual a 27 Kg. /m²).
- Obesidad central.
- Aumento de peso.
- Hipertensión arterial (mayor o igual a 140/90 mm Hg.).
- Colesterol de alta densidad (menor o igual a 35 mg/dL).
- Triglicéridos (mayor o igual a 250 mg/dL en ayunas).
- Tabaquismo.
- Dieta rica en carbohidratos.
- Alteraciones en pruebas de funcionamiento hepático sin causa aparente.
- Neuropatías periféricas.
- Albúmina en orina.
- Síndrome de ovario poliquístico.
- Ácido úrico elevado en sangre.
- Insuficiencia arterial.

2.1.4 Control farmacológico de la diabetes tipo 2

En la actualidad la terapia para la DT2 se enfoca principalmente a reducir la hiperglucemia, ya que el control de los niveles de glucosa en sangre reduce el riesgo de desarrollar complicaciones de la diabetes. Por ello es importante corregir los factores que intervienen en ella, junto con una terapia farmacológica, se recomienda hacer ejercicio y seguir una dieta adecuada al estilo de vida y tratar oportunamente padecimientos infecciosos.

El tratamiento de la diabetes es más que una simple corrección de los niveles de glucosa en sangre, es la suma de intervenciones y cambios en el estilo de vida .

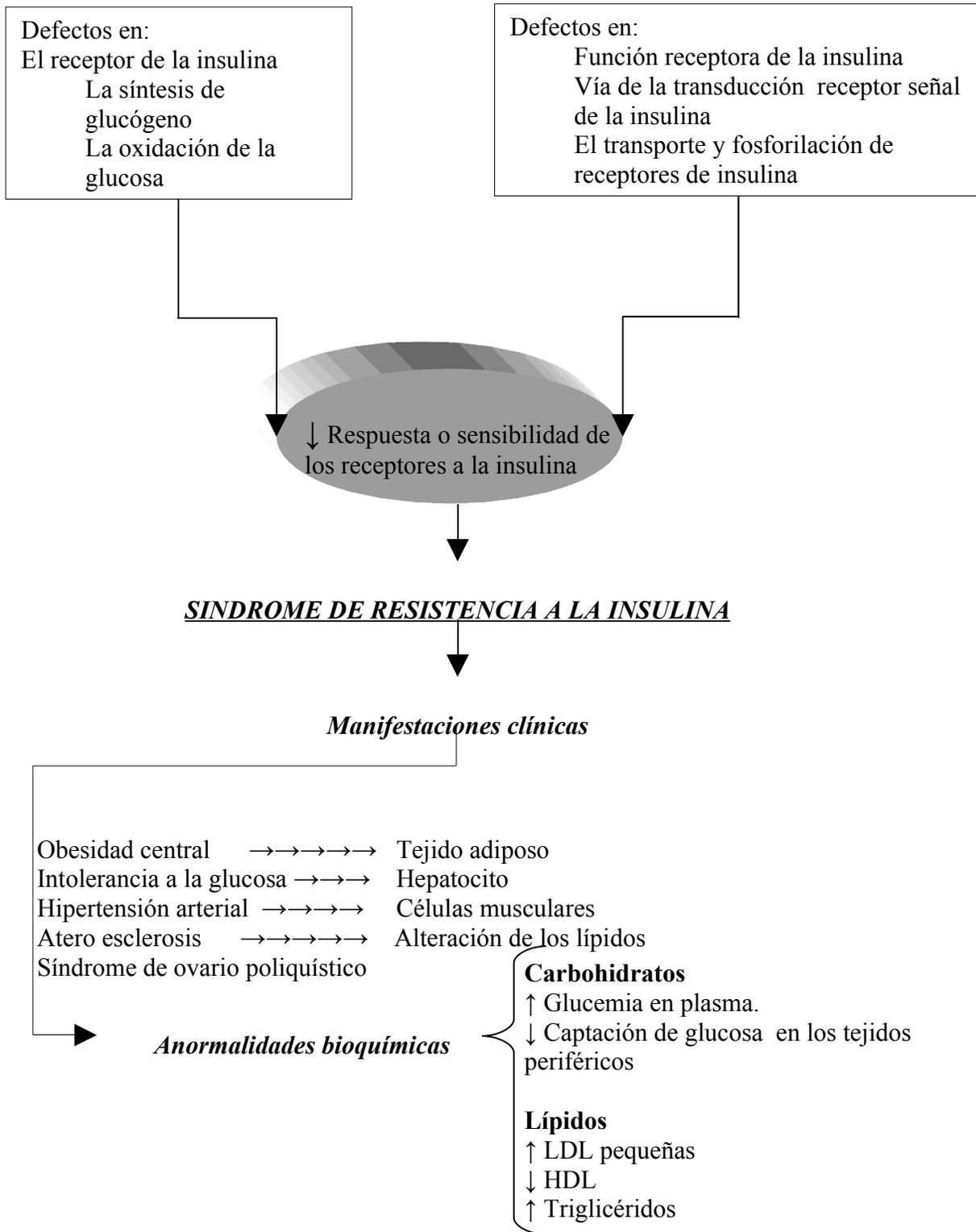
Tabla 3. Principales fármacos utilizados para control de hiperglucemia⁵

Tipo de fármaco y ejemplos	Modo de acción
<ul style="list-style-type: none">▪ Sulfonilureas. Clorpropamida, glibenclamida, tolbutamida.	Reduce la hiperglucemia al aumentar la liberación de insulina de los islotes pancreáticos.
<ul style="list-style-type: none">▪ Tiazolidinedionas Troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona	Aumentan la utilización de glucosa en tejidos periféricos, estimulando o inhibiendo la transcripción de múltiples genes.
<ul style="list-style-type: none">▪ Inhibidores de la α-glucosidasa. Acarbosa, vogliobosa, miglitol	Interfieren con la absorción intestinal de glucosa, evitando la producción de carbohidratos sencillos (fructosa, glucosa, etc.) los cuales pueden ser absorbidos.
<ul style="list-style-type: none">▪ Biguanidinas. Metformin.	Reducen la resistencia a insulina, inhiben la producción de glucosa hepática y aumentan la utilización de glucosa en tejido muscular, estimulando el almacenamiento de glucosa.
<ul style="list-style-type: none">▪ Nateglinida y repuglinida	Estimulan la secreción rápida y corta de insulina al unirse al receptor de sulfonilureas durante unos cuantos segundos.

2.1.5 Resistencia a la insulina

Después de la ingestión de alimentos, el mantenimiento de la tolerancia normal a la glucosa depende de tres eventos que se presentan en una forma interrelacionada: a) estimulación de la secreción de insulina; b) supresión de la producción de glucosa endógena mediada por la insulina (principalmente hepática) y c) estimulación de la fijación de la glucosa en los tejidos periféricos, mediada por la insulina principalmente en el tejido muscular y adiposo. En los pacientes con diabetes tipo 2, la tasa de producción de glucosa hepática basal es excesiva, a pesar de las concentraciones de insulina en plasma que se incrementan de dos a cuatro veces⁶. Estos hallazgos proporcionan evidencia inequívoca de la resistencia hepática a la insulina, evidenciada por la capacidad disminuida de la insulina para suprimir la producción de glucosa hepática⁷. **La resistencia a la insulina puede definirse como una disminución de la respuesta o de la sensibilidad de los efectores a la acción de esta hormona.** Los efectores de la insulina incluyen, principalmente, a las células musculares, los adipocitos, los hepatocitos y las mismas células beta de los islotes pancreáticos⁸. Los defectos en la función receptora de la insulina, en la vía de transducción receptor-señal de la insulina, en el transporte y fosforilación de la glucosa, en la síntesis de glucógeno y en la oxidación de la glucosa, contribuyen a la resistencia muscular a la insulina⁹ ([Figura 2](#)). La consecuencia inmediata de la insulino-resistencia es el incremento compensador de la secreción de estas células, produciéndose el hiperinsulinismo, sin que las concentraciones elevadas de insulina se acompañen de hipoglucemia¹⁰. A medida que la secreción de insulina disminuye progresivamente, el nivel de glucosa en plasma en ayunas se incrementa a más de 7.8 mmol/L (> 140 mg/dL), y esencialmente todos los pacientes diabéticos con un nivel de glucosa en plasma en ayunas que excede los 180 a 200 mg/dL, presentan una respuesta de la insulina en plasma que es deficiente en términos absolutos^{11,12}.

Figura 2. Manifestaciones clínicas y principales anomalías bioquímicas del síndrome de resistencia a la insulina



2.1.6 Diabetes gestacional.

Causado por la resistencia a la insulina y la relativa deficiencia en la secreción de ésta asociada con el embarazo. Ocurre aproximadamente de 3% a 5% de todos los embarazos.

2.1.7 Otros tipos específicos de diabetes.

Este tipo comprende un heterogéneo grupo etiológico, que incluye aquellos casos de diabetes en los cuales las causas están establecidas o al menos parcialmente conocidas. Las causas incluyen defectos genéticos conocidos que afectan la función de las células β o la acción de la insulina, pero la etiología precisa no ha sido establecida. Comprende aproximadamente 1% a 2% de casos en síndrome diabético.

2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES.

Las complicaciones de la diabetes pueden ser agudas o crónicas. Las primeras (cetoacidosis o coma hiperosmolar) son poco frecuentes como manifestación inicial de la enfermedad, y comúnmente el paciente se identifica cuando presenta algunas complicaciones crónicas. Estas últimas se clasifican en micro y macrovasculares. Las primeras se asocian con daño al endotelio y músculo liso de capilares o vasos de pequeño calibre, dando lugar al engrosamiento de sus membranas basales, lo que lleva a angiopatía oclusiva, hipoxia y daño tisular y se manifiestan como nefropatía, retinopatía y neuropatía. La magnitud de este tipo de complicaciones se correlaciona con la severidad y duración de la hiperglucemia. Así, niveles posprandiales de glucosa superiores a 11 mM, se asocian con complicaciones renales, retinianas y neurológicas, que pueden manifestarse cinco o diez años después de iniciada la enfermedad.^{13,14}

Las complicaciones macrovasculares¹⁵ son las más comunes y una de las principales causas de muerte en la diabetes tipo 2, e incluyen aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón. La asociación de aterosclerosis con hiperglucemia no es consistente, en cambio, la hiperglucemia posprandial y la concentración sérica de insulina predicen mejor el riesgo de aterosclerosis.¹⁶ El paciente diabético presenta mayor riesgo de desarrollar dislipidemia y enfermedades cardiovasculares teniendo dos a cuatro veces más probabilidades de sufrir infarto al miocardio y trastornos asociados con aterosclerosis.

Las complicaciones inducidas por la hiperglucemia, se originan por cambios químicos y funcionales de macromoléculas, alteración en la expresión genética y disfunción endotelial, conducentes a un estado profibrótico, proinflamatorio y procoagulante.¹⁷ En el endotelio hay aumento en la liberación de factores procoagulantes y desequilibrio en la producción de sustancias vasoactivas, con menor formación de vasodilatadores (óxido nítrico) y mayor liberación de vasoconstrictores (endotelina-1), lo que lleva a fallas hemodinámicas y favorece aterosclerosis e hipertensión. En diversos tejidos aumenta la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), proteínas de matriz extracelular, citocinas y factores del crecimiento, incluyendo: al factor de necrosis

tumoral α (TNF α) y los factores de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF) y transformante β (TGF β), las consecuencias de lo anterior dependen del lugar donde esto ocurre. La sobreproducción del VEGF en la retina ocasiona ruptura de la barrera de permeabilidad vascular, migración de leucocitos, inflamación y neovascularización patológica y como consecuencia retinopatía diabética proliferativa, una de las causas principales de ceguera.¹⁸

La mayor producción de proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágena tipo IV), PAI-1 y TGF β (factor profibrótico), promueven la acumulación de matriz extracelular y llevan al engrosamiento de la membrana basal de capilares sanguíneos en glomérulos y retina,¹⁹ y en expansión de la matriz mesangial en riñón, responsables del desarrollo de nefropatía diabética. Contribuye también la inhibición, por PAI-1, de la cascada proteolítica involucrada en la degradación de la matriz extracelular. En ocasiones, el balance entre proteasas y sus inhibidores favorece la degradación de la matriz extracelular; ya que la hiperglucemia indirecta o directamente aumenta la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular, dando origen a alteraciones histológicas de los grandes vasos y aumentando el riesgo de ruptura de la placa aterosclerótica.²⁰

2.3 MECANISMOS INDUCTORES DE LAS COMPLICACIONES

Todos los tipos de diabetes (DT) se caracterizan por el desarrollo de patologías micro y macrovasculares; sin embargo para explicar como se desarrollan estas patologías, se han generado varias hipótesis (Tabla 4) acerca de como la hiperglucemia origina cambios químicos y funcionales en proteínas, alteración en la expresión de genes y daño endotelial. En los órganos y tejidos que no requieren insulina para captación de glucosa son en los cuales se presentan principalmente las complicaciones crónicas en condiciones de hiperglucemia (riñón, retina, cristalino, corazón y sistema nervioso central).

La hiperglucemia crónica provoca aumento de especies reactivas de oxígeno como resultado de su autoxidación, por lo que su metabolismo propicia la acumulación de metabolitos como la fructosa, sorbitol y triosas fosfato. Estos últimos generan α -oxoaldehídos reactivos con alta capacidad de unirse a proteínas y generar estrés oxidativo. Además hay aumento de la síntesis de diacilgliceroles a partir de las triosas fosfato, las cuales activan a la proteína cinasa C (PKC). Por otra parte estas desregulaciones metabólicas causan alteraciones y daño tisular, lo que propicia las complicaciones en los pacientes diabéticos.

Tabla 4. Mecanismos por los cuales la hiperglucemia provoca daño tisular.

- Generación de estrés oxidativo.
- Incremento en la activación en la vía del sorbitol.
- Incremento en la vía de las hexosaminas
- Autoxidación de la glucosa.
- Activación de isoformas de PKC.
- Glucosilación no enzimática.

2.3.1 Glicación

A pesar que desde 1912 Maillard describió el proceso de glicación en los alimentos, cinco décadas más tarde se encontró la primera proteína glicada *in*

vivo, la hemoglobina A1C, uno de los mejores marcadores del control de la glucemia a largo plazo.²¹

La glicación involucra una serie de reacciones no enzimáticas, que inician con la condensación de los grupos carbonilos de los carbohidratos con grupos amino, en las proteínas el ϵ -amino de la lisina y amino terminal, formando una base de Schiff, que por rearrreglos moleculares reversibles, forma productos tempranos de glicación o de Amadori. Estos, por deshidratación, oxidación y fragmentación, originan los primeros productos de glicación avanzada (AGEs) (carboximetil-lisina) y α -dicarbonilos o α -oxoaldehídos, como: 3-desoxiglucosona, metilglioxal y glioxal, que al reaccionar con grupo guanidino originan AGEs derivados de la arginina,²² o al combinarse simultáneamente con dos aminoácidos básicos constituyen puentes cruzados que influyen en la agregación proteica. La glicación intracelular depende de ellos; debido a que también se forman a partir de triosas-fosfato.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) originan compuestos similares a los AGEs. La acción combinada de estrés oxidativo y glicación es aún más dañina y se conoce como glicooxidación, lo que se amplifica por productos de lipoperoxidación, como malondialdehído y glioxal.^{23, 24}

Los AGEs son muy estables y modifican proteínas plasmáticas, intracelulares (citoesqueleto, histonas), mielina y de la matriz extracelular; afectando estructuras susceptibles, como la pared arterial, mesangio, glomérulos renales, vasculatura retiniana, cristalino, perineurium y fibras nerviosas. La acumulación de AGEs, crea pérdida de elasticidad y funcionalidad de la matriz extracelular o una respuesta inflamatoria por el reclutamiento de macrófagos.²⁵

Los AGEs interactúan con receptores en la superficie celular²⁹, entre otros, receptores de AGE (RAGE), oligosacaril-transferasa (AGE-RI), fosfoproteína 80K-H (AGE-R2), galectina-3 (AGE-R3), megalina y receptores carroñeros (ScR-II y CD369).^{30,31} Exceptuando al primero, conducen a endocitosis y degradación de sus ligandos y su deficiencia favorece la acumulación de AGEs y el daño tisular. La activación de RAGE desencadena mecanismos de señalización mediados por la NADPH oxidasa y ERO. También agiliza la respuesta inflamatoria, al estimular

proliferación de macrófagos y músculo liso arterial y aumentar la expresión de citocinas proinflamatorias y PAI-1. En macrófagos, estimula la producción de interleucina 1 (IL-1) y TNF α , mientras que en los glomérulos renales induce la síntesis de colágena tipo IV, asociada con la glomérulo esclerosis.^{26,27}

Al ligarse RAGE con citocinas proinflamatorias S100 o calgranulinas, amfoterina, transtiretina, y péptido amiloide β , se piensa que participa en la propagación de mecanismos proinflamatorios en respuesta al daño tisular. Debe señalarse, que las calgranulinas están aumentadas en tejidos del paciente diabético.

Se ha identificado en la circulación, una variante soluble de RAGE, llamada RAGE endógeno secretor (esRAGE), éste actúa como un señuelo, evitando que se active el receptor de membrana. Se produce en el endotelio vascular y pericitos, probablemente su expresión está relacionada con diferencias individuales en la susceptibilidad para desarrollar complicaciones. La administración de RAGE soluble evita las complicaciones diabéticas en animales de experimentación, por lo que esRAGE o bien un péptido derivado pueden emplearse como agentes preventivos.²⁶

No obstante que los AGEs son removidos principalmente hasta que las proteínas son degradadas, su concentración se regula por:

- a. La oxoaldehído reductasa y aldosa reductasa dependientes de NADPH, que remueven a sus precursores α -dicarbonilos.
- b. El sistema de glioxalinas I y II, que metabolizan metilglioxal en presencia de glutatión.
- c. Transglicación o transferencia del azúcar de las bases de Schiff a un nucleófilo intracelular, principalmente glutatión.
- d. Degradación de productos de Amadori por amadoriasas, como la fructosamina oxidasa y la fructosamina 3 cinasa.

Las amadoriasas podrían no ser benéficas al generar α -dicarbonilos glicantes, mientras que la transglicación puede explicar diferencias individuales y tisulares en

el almacenamiento de AGEs y por lo tanto diferencias en la susceptibilidad al daño causado por ellos.

Estrategias dirigidas contra la acumulación y acción de AGEs pueden prevenir las complicaciones diabéticas, entre ellas:

- Remoción de triosas-fosfato precursoras de α -dicarbonilos. La tiamina (vitamina B1) o benoxígenotiamina aumentan la actividad de la transcetolasa, que convierte al gliceraldehído-3-fosfato en azúcares, evitando la formación de AGEs, previniendo la microalbuminuria y retinopatía en ratas diabéticas.
- Bloqueo de dicarbonilos por aminoguanidina, piridoxamina (intermediario de vitamina B6) y metformina. La aminoguanidina es tóxica en humano, la piridoxamina se encuentra en estudios clínicos fase II y es muy prometedora por carecer de toxicidad. La metformina es empleada como sensibilizador a insulina.
- Bloqueo de los productos de Amadori por amadorinas, como piridoxamina.
- Ruptura de los puentes cruzados mediante agentes como PTB (bromuro de N-fenaciltiazolio) y ALT-711 [Cloruro de 4,5-dimetil-3-(2-oxo-2-feniletil)-tiazolio].²⁷

2.3.2 Vía del sorbitol

En órganos y tejidos, cuya captación de glucosa no requiere insulina y en los cuales se presentan las complicaciones crónicas (riñón, retina, cristalino, corazón y sistema nervioso), la glucosa a altas concentraciones se metaboliza por la vía del sorbitol o de los polioles. En ella, la glucosa es transformada por acción secuencial de las enzimas: aldosa reductasa (AR) y sorbitol deshidrogenasa (SDH). La primera la reduce irreversiblemente a sorbitol y requiere NADPH como coenzima. Esta enzima controla la vía y es activada por concentraciones altas de glucosa. La segunda convierte al sorbitol en fructosa con formación de NADH. Ambas reacciones repercuten en las complicaciones diabéticas, tanto por la acumulación de sorbitol, fructosa y NADH, como por la baja disponibilidad de NADPH.²⁸

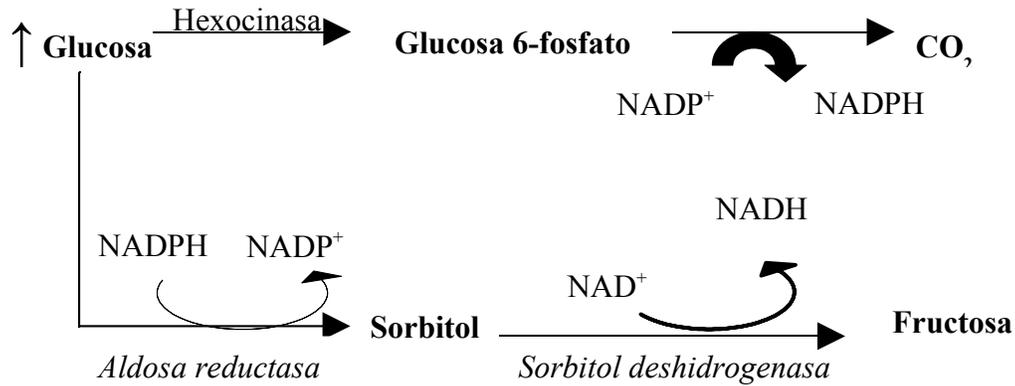
Como el NADPH es requerido para la actividad de óxido nítrico sintasa, NADPH oxidasa, glutatión reductasa y catalasa, su agotamiento conduce a deficiencia de los sistemas antioxidantes dependientes del glutatión y de catalasa, y a la baja disponibilidad de óxido nítrico. Para que el glutatión realice su acción como principal antioxidante intracelular, es indispensable que se regenere su forma reducida (GSH) por acción de la glutatión reductasa. De igual manera la activación de catalasa depende de NADPH.^{29,30}

En la mayoría de los tejidos, excepto el hígado, la fructosa es fosforilada a fructosa-6-fosfato por una hexocinasa específica, al entrar ésta a la glucólisis, ambas vías se acoplan (Figura 6), como se ha descrito en tejido cardíaco durante la isquemia-reperfusión y en glomérulos de ratas diabéticas^{31,32} y lleva a las siguientes alteraciones metabólicas:

- a). Acumulación de intermediarios glucolíticos, principalmente triosas-fosfato como el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), ambos forman α -oxoaldehídos capaces de glicar proteínas y generar estrés oxidativo.
- b). Aumento de la relación NADH/NAD⁺ debido a la producción de NADH por la SDH y baja en la capacidad de regenerar NAD⁺ en la glucólisis.³³
- c). Inhibición de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Lo que se debe a múltiples causas⁴⁷⁻⁵¹ y determina la acumulación de triosas-fosfato. La enzima cataliza la oxidación del G3P a 1,3 bis-fosfo-glicerato, el primer intermediario de alta energía en la glucólisis y genera NADH³¹⁻³⁴.

La acumulación de sorbitol debido a su incapacidad para difundir con facilidad al exterior, produce aumento de estrés osmótico en las células, lleva a daño del cristalino y desarrollo de cataratas en ratas diabéticas, por lo que el uso de inhibidores de la AR previene o retarda significativamente la formación de cataratas. Sin embargo, la acumulación de sorbitol no es suficiente para explicar la neuropatía, retinopatía y nefropatía diabéticas, ya que su concentración en los órganos afectados, es mucho menor que la observada en los cristalinos³⁵⁻³⁷.

Figura 3. Vía del sorbitol



2.3.3 Activación de la vía de las hexosaminas

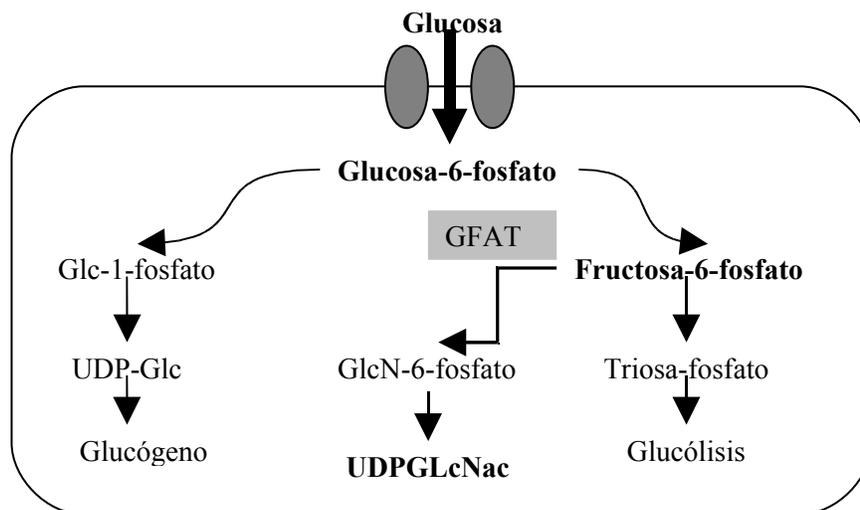
La acumulación de fructosa y fructosa-6-fosfato como consecuencia del aumento en la vía del sorbitol conduce a estimular la vía de las hexosaminas; ya que su primer intermediario, la glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de fructosa-6-fosfato y glutamina, mediante la reacción irreversible catalizada por la glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT). La glucosamina-6-fosfato da origen a UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina, ambas requeridas para la glicación de glicoproteínas y proteoglicanos. El aumento de actividad por esta vía se asocia con la resistencia a la insulina, complicaciones diabéticas y aterogénesis; ya que lleva a disminuir la actividad de la óxido nítrico sintasa, estimular la expresión de TGF α y β 1, PAI-1 y del represor de la transcripción, proaterogénico Id2, como consecuencia de la alteración de vías de transmisión de señales y modificaciones postraduccionales de proteínas.^{38,39,40,41,42}

La N-acetilglucosaminilación o adición de N-acetilglucosamina a residuos de serina o treonina, catalizada por la O-Glucosamil-N-acetil transferasa (OGT), ocurre en diversas proteínas incluyendo, factores de transcripción (Sp1, c-myc, CREBP y STAT-5), enzimas (glucógeno sintasa, RNA polimerasa 2 y óxido nítrico sintasa endotelial) y en los substratos del receptor de insulina 1 y 2. La N-

acetilglucosaminilación de Sp1 y CREBP los activa, el primero induce la expresión de TGF β 1 y PAI-1, mientras que el segundo aumenta la expresión de fibronectina. Por otra parte, la glucosaminilación de óxido nítrico sintasa endotelial impide su activación por fosforilación.^{41,43,44}

La acumulación de glucosamina, al interferir con el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (RE), provoca sobrecarga de proteínas mal plegadas y estrés del organelo; asociado con esteatosis hepática y aterosclerosis. Un efecto similar se observa con homocisteína, obesidad y acumulación de colesterol libre intracelular, factores que con frecuencia se presentan en diabetes y aterosclerosis agudizando los efecto de la glucosamina.

Figura 4. Vía de las hexosaminas



Después de entrar a la célula vía transportador de glucosa, ésta es fosforilada a glucosa-6-fosfato y utilizada principalmente para la síntesis de glucógeno y glucólisis. En condiciones normales la vía de las hexosaminas recibe del 1-3% de la glucosa entrante vía la conversión de fructosa-6-fosfato a glucosamina -6-fosfato (GlcN-6-fosfato) por la enzima limitante: fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT). El principal producto de esta ruta es la uridindifosfoglucosa-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNac) que actúa como sustrato para todas las rutas de glicosilación.

2.3.4 Activación de la proteína cinasa C

La proteína cinasa C (PKC) pertenece a la familia de las serina/treonina fosfocinasas, y presenta por lo menos once isoformas codificadas por 10 genes diferentes, clasificados en cuatro clases: las convencionales o clásicas (dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos; α , $\beta 1$, $\beta 2$ y γ), las nuevas (independientes de Ca^{2+} ; δ , ϵ , η y θ), las atípicas (ζ y λ) y las independientes de Ca^{2+} y fosfolípidos (μ)

La hiperglucemia es acompañada de la activación anormal de la PKC, como consecuencia del incremento en la formación de diacilgliceroles en células del endotelio, retina y glomérulos renales de organismos con complicaciones diabéticas. Así como, en células vasculares cultivadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (22 mM). El incremento de DAG se atribuye a su síntesis *de novo* a partir de triosas intermediarias de la glucólisis, en particular de la DHAP que se acumula debido a las alteraciones metabólicas ya discutidas. Sin embargo, recientemente se ha descrito, que al menos en células del músculo liso vascular, la formación de DAG depende de la acción de la fosfolipasa C, enzima cuya fosforilación y activación es inducida en estas células por concentraciones altas de glucosa, a través de un mecanismo poco conocido mediado por la aldosa reductasa, primera enzima de la vía de los polioles. Otros activadores de la PKC son el metilglioxal, glucosamina, AGEs y ERO. Todos ellos son el resultado de las alteraciones metabólicas en la diabetes.^{46,47,48,49,50}

Las alteraciones tisulares atribuidas a la activación de la PKC son muy variadas, y dependen de su participación en los mecanismos de transducción de señales e inducción de la expresión de diversos genes, asociados con la patología de la diabetes, incluyendo a los de proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo IV), PAI-1, VEGF, TGF β y su receptor y de NADPH oxidasa. Además, afecta la producción de la sintasa del óxido nítrico y estimula la expresión de endotelina-1, vasoconstrictor potente que se encuentra incrementado en pacientes con diabetes tipo 2 o con complicaciones ateroscleróticas. Cabe mencionar que la activación de la NADPH oxidasa, vía PKC, se acompaña con la producción de ERO y estrés oxidativo.^{45,50,51,}

2.3.5 Aumento del estrés oxidativo

La mayoría de los cambios metabólicos, derivados de las concentraciones altas de glucosa, promueven estrés oxidativo, debido a la formación de ERO y disminución en la capacidad antioxidante. Las ERO se originan principalmente por la cadena respiratoria mitocondrial y activación de NADPH oxidasa. Por ambos se produce el radical anión superóxido, del cual derivan el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, adjuntamente se produce peroxinitrito al reaccionar el superóxido con el óxido nítrico. Todos ellos son oxidantes altamente reactivos y el consumo de óxido nítrico disminuye su biodisponibilidad, contribuyendo así al daño vascular.^{52,53}

La cadena de transporte de electrones mitocondrial la conforman cuatro complejos enzimáticos (I, II, III y IV), el citocromo C y la ubiquinona o coenzima Q (movilizador de electrones). El flujo de electrones inicia a partir de NADH y FADH₂ provenientes de la glucólisis o del ciclo de Krebs. Los electrones fluyen hasta el oxígeno para formar agua, pero cuando se intensifica el gradiente de protones en la membrana mitocondrial, se inhibe el transporte de electrones al Complejo III y éstos se acumulan en la coenzima Q, lo que provoca que el oxígeno se reduzca parcialmente para formar al anión superóxido. La reducción acelerada de la coenzima Q y formación de ERO marcan el inicio de la disfunción mitocondrial, involucrada en los desordenes metabólicos y tisulares de la diabetes y otras enfermedades.⁵³

La principal fuente de ERO durante la hiperglicemia depende del tipo celular, en el endotelio vascular es la mitocondria, mientras que en el mesangio renal es la NADPH oxidasa.

El efecto deletéreo de las ERO se atribuye a modificaciones oxidativas de diversas moléculas al ocasionar lipoperoxidación, daño a membranas, ruptura del DNA y muerte celular. Siendo el DNA mitocondrial muy susceptible por carecer de histonas. El daño al DNA induce su reparación y activación de la poli (ADP)-ribosa polimerasa (PARP), cuya actividad puede conducir a la muerte celular. La sobreexpresión en la mitocondria de la proteína desacoplante 1 o la superóxido dismutasa, dependiente de manganeso, evitan la muerte celular inducida por altas concentraciones de glucosa. La primera al impedir que se intensifique el gradiente

de protones y la segunda al consumir al superóxido, y con ello ambas evitan la activación de PARP.

El aumento de ERO en el paciente diabético y en modelos experimentales, está presente aún antes de que las complicaciones diabéticas sean evidentes. Por lo cual, se ha sugerido que no solo se asocian con sus complicaciones, sino también con el desarrollo de resistencia a la insulina.

Aunque la hiperglucemia y la diabetes se relacionan con una disminución en la capacidad antioxidante global, la respuesta de los distintos componentes de la defensa antioxidante es variada, dependiendo de los tejidos implicados y de la severidad de la enfermedad. Lo anterior, se ha hecho patente por resultados experimentales contradictorios cuando se analizan metabolitos o enzimas antioxidantes individuales, por ejemplo, algunas enzimas como la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa, aumentan como respuesta compensatoria al estrés oxidativo. Sin embargo, por lo general se observa un declive en los sistemas antioxidantes, debido a la poca disponibilidad de glutatión reducido y NADPH. La deficiencia en NADPH durante la hiperglucemia, se debe a que se consume en la vía de los polioles, y a que disminuye la actividad y expresión de una de las principales enzimas que lo forman, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en órganos como el riñón, hígado y páncreas. La actividad de esta enzima en el páncreas de rata disminuye aún en condiciones de hiperglucemia leve o intolerancia a la glucosa y se ha encontrado que su deficiencia es un factor que predispone a la diabetes en poblaciones humanas.

2.4 GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

La G6PDH es una enzima que pertenece al grupo de las enzimas lipogénicas. Esta familia de enzimas incluye la ácido graso sintasa, acetil-coenzima A carboxilasa, ATP citrato liasa, enzima málica y G6PDH, estas enzimas catalizan reacciones para la síntesis de novo de ácidos grasos. En especial la enzima G6PDH es considerada como una enzima lipogénica debido a que provee el sustrato NADPH, para la producción de palmitato por la ácido graso sintasa.⁵⁴

La G6PDH es la enzima que limita la vía de las pentosas fosfato que además de proveer el NADPH genera precursores para la síntesis de los ácidos nucleicos. El gen de la G6PDH en los mamíferos se localiza en el cromosoma X, tiene una extensión de 18kb y es considerado como un gen que se expresa constitutivamente en varios tejidos y en especial en el tejido adiposo, en el hígado, pulmón y células que proliferan.⁵⁴

Este gen es modulado por diferentes estímulos externos incluyendo las hormonas: insulina, el β -estradiol, la dihidroepiandrosterona, la adrenalina, la cortisona y la tirosina; así como el factor de crecimiento epidermal (EGF) que induce la expresión del gen de la enzima. Los carbohidratos en la dieta incrementan la síntesis de G6PDH, en especial con glucosa seguida de sacarosa y fructosa, la magnitud de este incremento es determinada por la cantidad de carbohidratos consumidos, contrario a este efecto la presencia de ácidos grasos en la dieta puede inhibirla.⁵⁵

Así como las hormonas y la dieta regulan la actividad de la enzima, el vanadato y el selenato inducen la expresión y actividad de la G6PDH ya que mimetizan la acción de la insulina. Dentro del grupo de vitaminas hidrosolubles la nicotinamida y el ácido nicotínico inducen la expresión del ARNm de la G6PDH en células de jurkat, este comportamiento también se observa con la forma oxidada de la vitamina C, reflejándose en el aumento en las concentraciones de glutatión e inhibición de la producción de H_2O_2 evitando de esta manera la muerte celular. Finalmente es de mencionar que dietas deficientes en cobre incrementan las concentraciones de la enzima en animales con diabetes experimental.^{56,57,58,59}

2.4.1. Oxidación de la glucosa: vía de las pentosas fosfato

La vía de las pentosas fosfato constituye una vía alterna para el metabolismo de la glucosa; no produce ATP pero cuenta con dos funciones importantes:

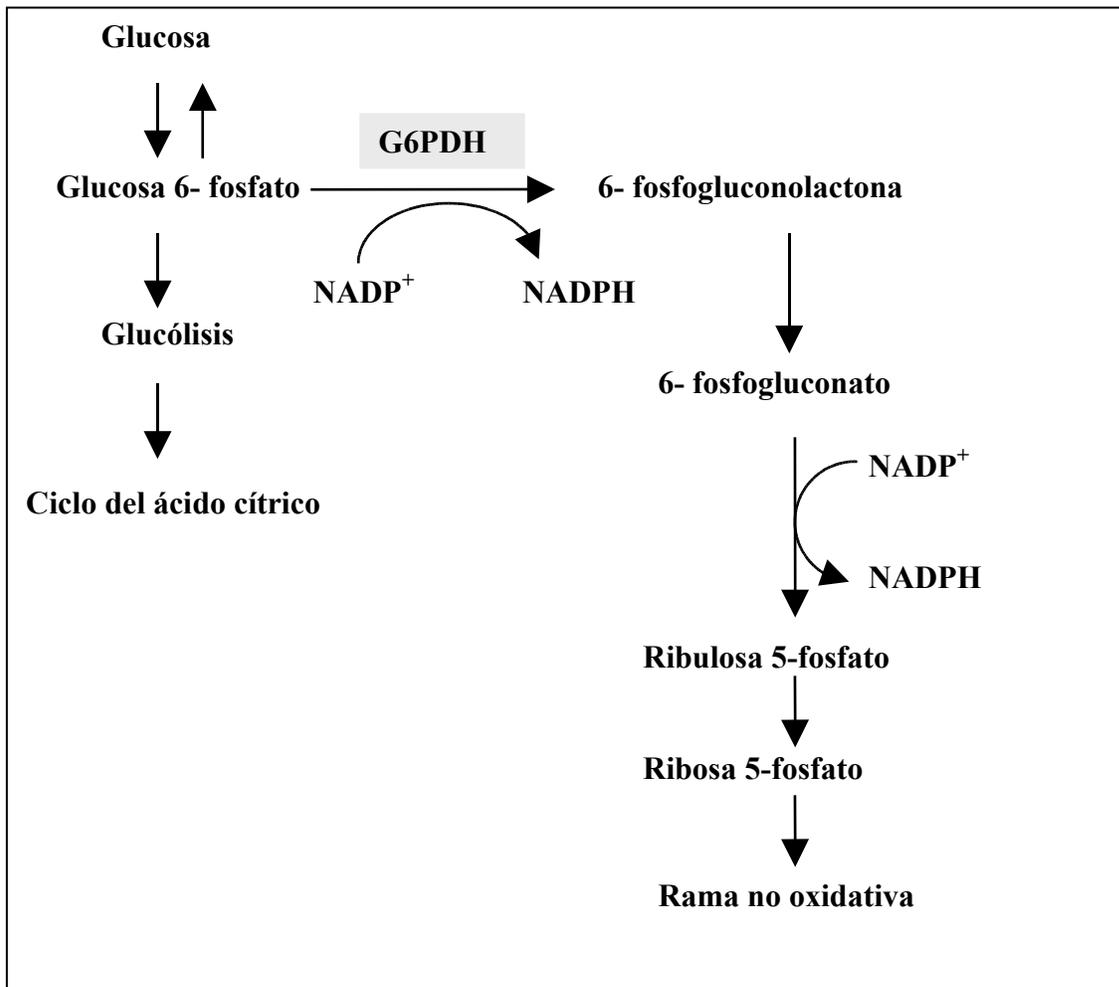
- Producción de NADPH, coenzima empleada para la síntesis reductora (de ácidos grasos y esteroides), reducción de peróxido de hidrógeno (vía redox del glutatión y catalasa), fagocitosis (NADPH oxidasa), y eliminar esteroides, alcoholes y drogas (sistema del citocromo P-450).
- Producción de residuos de ribosa para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

La ruta de las pentosas fosfato actúa en dos fases: oxidativa y no oxidativa; en la fase oxidativa la primera reacción es catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que oxida a la glucosa 6-fosfato a la correspondiente lactona. Esta lactona se hidroliza por una lactonasa específica a 6-fosfogluconato, que experimenta una descarboxilación oxidativa, para dar CO₂, NADPH y una pentosa fosfato, la ribulosa-5-fosfato. En la fase no oxidativa parte de la ribulosa-5-fosfato se convierte en otros azúcares de cinco carbonos, incluyendo la ribosa-5-fosfato; la cual puede utilizarse en la síntesis de nucleótidos o en el siguiente paso de la ruta de las pentosas. Posteriormente una serie de reacciones convierten tres moléculas de azúcares de cinco carbonos, en dos moléculas de un azúcar de seis carbonos y una molécula de un azúcar de tres carbonos. Algunos de estos azúcares se convierten en glucosa-6-fosfato, y el ciclo se repite.⁶⁰

El destino real de los azúcares fosfato, depende de las necesidades metabólicas de la célula en la que se está desarrollando la ruta. Si la necesidad principal radica en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, el principal producto es la ribosa-5-fosfato, y no se producen la mayor parte de los reordenamientos de la fase no oxidativa. En contraste, si la necesidad principal es la generación de NADPH, la fase no oxidativa genera compuestos que pueden convertirse con facilidad en glucosa-6-fosfato. Por último, una célula con necesidades moderadas de NADPH y de pentosas fosfato, la fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato producidos en la fase no oxidativa pueden catabolizarse en mayor medida mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. Dadas las múltiples necesidades metabólicas de una célula, es improbable que ninguno de estos tres modos de actuación se

emplee de manera exclusiva en una determinada célula. Los tejidos con mayor actividad de la vía son: hígado, glándula mamaria, tejido adiposo y corteza adrenal; quienes cuentan con un sistema enzimático completo, cerca del 30% de la oxidación de la glucosa que tiene lugar en el hígado transcurre por esta ruta (Figura 5).

Figura 5. Vía de las pentosas fosfato



2.4.2. Importancia de la G6PDH

La ruta de las pentosas es especialmente activa en la generación de poder reductor en los eritrocitos de los vertebrados y sin la participación de la G6PDH no se podría llevar a cabo. La G6PDH es considerada como una de las enzimas antioxidantes intracelulares más importantes de respuesta al estado redox, en un ambiente de estrés oxidativo incrementado, debido a que la enzima es la principal fuente generadora de NADPH requerido por otros sistemas antioxidantes tales como el sistema catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y el péptido glutatión. Las evidencias han demostrado que la condición de estrés, estriba principalmente en cambios en la actividad de la G6PDH, siendo esencial la expresión del gen que codifica para la G6PDH en la protección de la célula.

Dentro de los estudios que asocian la G6PDH y el estrés oxidativo, destacan los realizados con células carentes del gen que codifica para la G6PDH, lo que indica ser altamente sensibles al estrés oxidativo, como sucede con los endotelios vasculares que a falta de NADPH se acumulan especies reactivas de oxígeno y el resultado es la disfunción endotelial.⁶⁰

En cultivos celulares bajo estrés oxidativo, el comportamiento de la actividad de la G6PDH tiende a incrementarse mientras el glutatión disminuye. Cuando la G6PDH alcanza su máxima pico el glutatión inicia su incremento. Este tipo de respuesta se considera como una adaptación celular, en células expuestas a peróxido de hidrógeno o a drogas que disminuyen los niveles de glutatión reducido. Contrario a esto, en diabetes experimental y en cultivos celulares expuestos a concentraciones altas de glucosa, la actividad de la G6PDH disminuye significativamente, es probable que el ambiente oxidativo generado por la hiperglucemia provoque cambios estructurales de la G6PDH.

2.4.3. Deficiencia de G6PDH

La importancia de la G6PDH se puso de manifiesto gracias a la investigación de un trastorno genético humano frecuente, el déficit de G6PDH. Durante la segunda guerra mundial se administró profilácticamente, el fármaco antipalúdico llamado primaquina a los miembros de las fuerzas armadas, como consecuencia de ello gran parte de los militares presentaron anemia hemolítica, lo que posteriormente se comprobó fue a causa de un déficit de G6PDH. Compuestos como la primaquina generan un estrés oxidativo que se manifiesta, por la aparición de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos en los eritrocitos. En condiciones normales estos peróxidos se inactivan gracias al glutatión reducido debido a su grupo tiol libre que constituye un importante mecanismo de protección contra el estrés oxidativo. El glutatión una vez oxidado se reduce gracias a la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH. En los eritrocitos el glutatión tiene una función muy importante y es la de mantener la hemoglobina en estado reducido (Fe^{2+}), así pues el eritrocito es especialmente sensible a la depleción del glutatión y puesto que la vía de las pentosas fosfato es prácticamente la única ruta de los eritrocitos para generar NADPH, los hace vulnerables al estrés oxidativo.⁶¹

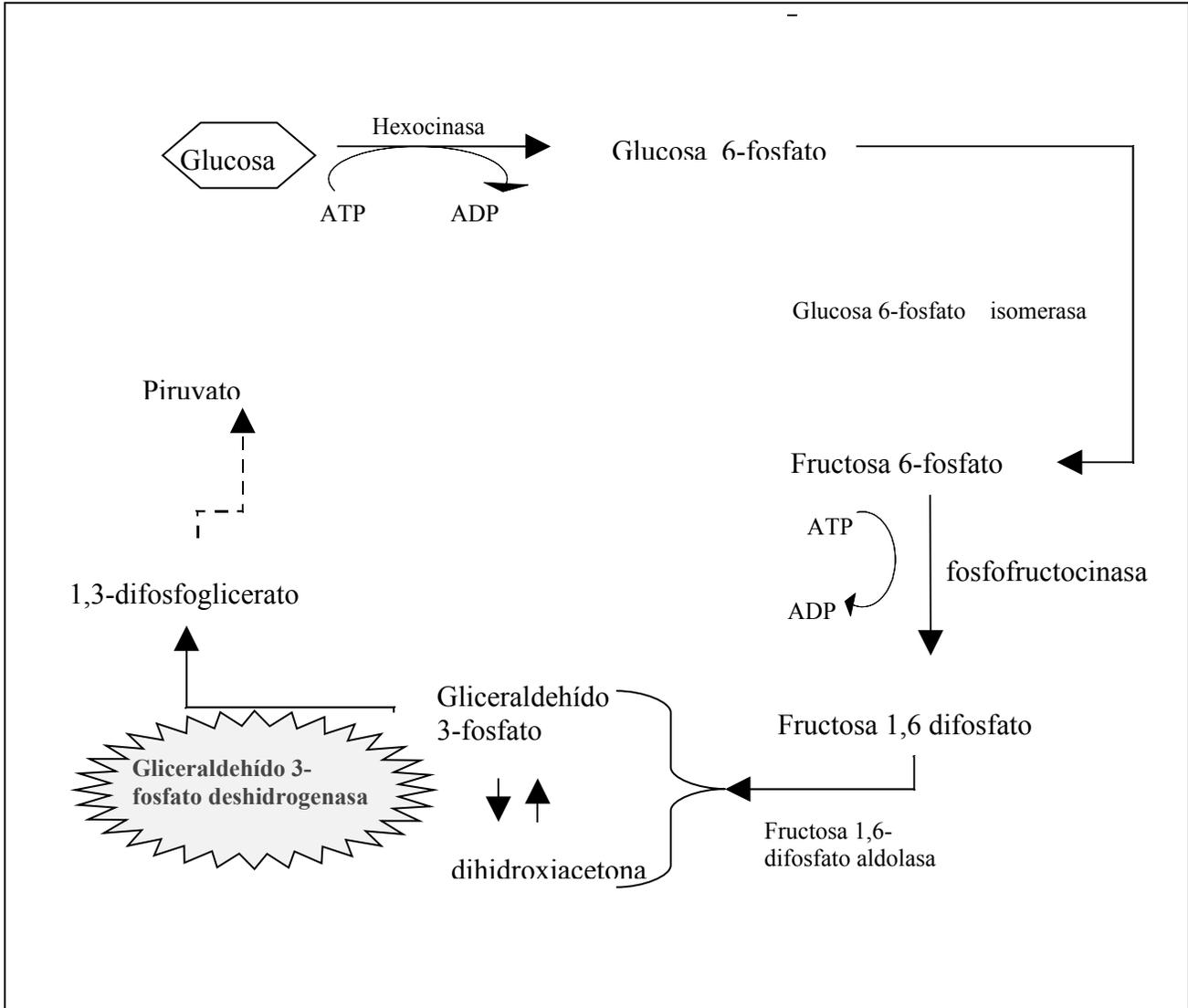
Al síndrome de deficiencia de la enzima en el humano se le conoce como favismo, enfermedad caracterizada por anemias hemolíticas y aumento en la sensibilidad oxidante del eritrocito. Los individuos con esta falla en condiciones de estrés oxidativo, como son la ingesta de habas (*Vicia faba*) o la administración de drogas del tipo antipalúdico, antipiréticos y analgésicos, cursan con crisis hemolíticas. Los individuos con este déficit son asintomáticos, hasta que se ven sometidos a un estrés oxidativo que genere una cantidad de peróxidos suficiente que agoten al glutatión reducido disponible. La reducción del glutatión oxidado resultante para producir de nuevo glutatión reducido se ve alterada, puesto que las concentraciones de NADPH son insuficientes para permitir la función de la glutatión reductasa. Ello hace que se acumule metahemoglobina (Fe^{3+}) a costa de la hemoglobina, lo que modifica la estructura de la célula, debilitando la membrana y haciéndola vulnerable a la ruptura o hemólisis.^{61,62}

2.5. GLICERALDEHÍDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA

La Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima multifuncional con actividad en citoplasma, membrana y núcleo, tradicionalmente es considerada como una enzima constitutiva, que pertenece a la vía glucolítica. GAPDH cataliza la reacción del 3-fosfoglicerato y forma complejos con enzimas por ejemplo la 3-fosfoglicerato cinasa en la vía glucolítica para generar 1,3-difosfoglicerato o por la 2,3- difosfoglicerato cinasa para producir 2,3-difosfoglicerato que es uno de los efectores alostéricos más importantes de la hemoglobina, ya que su concentración intracelular cambia en respuesta a la alteración de condiciones normales. Dentro de la serie de variadas actividades biológicas que posee es como proteína de membrana durante la endocitosis, en el citoplasma está involucrada en el control traslacional de la expresión génica, en el núcleo funciona como exportador de tARN durante la replicación y reparación del ADN; así como en la apoptosis de algunas células.^{63,64}

La actividad de GAPDH es extremadamente sensible a modificaciones debidas a los procesos celulares, tal es el caso de la diabetes. Esta enzima contiene en su sitio activo un grupo tiol, el cual es altamente reactivo y por lo tanto sensible a la modificación por muchos compuestos, dentro de estos encontramos aldehídos reactivos, agentes glicantes y radicales oxidativos lo que nos conduce a la pérdida de su actividad. En la diabetes se encuentran incrementadas las concentraciones de estos compuestos y disminuída su capacidad de generar NAD^+ , pues la actividad de esta enzima depende de la regeneración de la forma oxidada de este nucleótido, ya que GAPDH controla un paso metabólico crucial que determina los niveles de precursores de metilglioxal (fuente de AGE's) y por lo tanto su producción.⁶⁵

Figura 6. Ubicación de la enzima Gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa en la glucólisis.



2.5.1. Inhibición de la GAPDH

Esta enzima desempeña un papel fundamental en la génesis de las complicaciones diabéticas, por lo tanto toda perturbación en el estado redox de las células, puede influenciar la actividad de GAPDH, uno de los principales factores de inhibición podría ser la acumulación de intermediarios glucolíticos anteriores a la acción de esta enzima.

Son múltiples las causas que reducen su actividad, entre ellas:^{66,67}

- Aumento en su degradación debido a la disociación de sus cuatro subunidades, causado por altas concentraciones de NADH generadas en la vía del sorbitol.
- Oxidación de sus grupos tiol (SH) necesarios para su actividad, como consecuencia del estrés oxidativo.
- Disminución de su expresión debido a la reducción de insulina, hormona que regula la transcripción del gen de la enzima.
- La acumulación de aldehídos que inhiben a la enzima.
- Decremento de NAD⁺ necesario para que actúe.
- Glicación de la enzima.

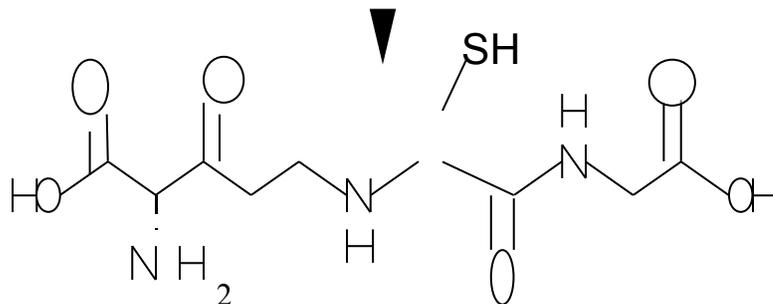
De este análisis se puede especular que la GAPDH, está involucrada en el estrés oxidativo de las células durante la diabetes, debido a que la concentración intracelular de la glucosa es alta, razón por la cual se genera estrés oxidativo y se altera el metabolismo mitocondrial aumentando la producción de superóxido reactivo, lo que activa los cuatro principales mecanismos de daño por hiperglucemia debida a la inhibición de GAPDH, estos mecanismos son:^{66,67}

- Aumento del flujo en la vía de los polioles o vía del sorbitol.
- Activación de la proteína cinasa C (PKC)
- Aumento del flujo en la vía de las hexosaminas
- Aumento en la formación de AGE's

2.6. GLUTATIÓN

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por los aminoácidos L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina, con un peso molecular de 307 (figura 7), en las células de mamíferos así como en plantas, es el tiol predominante en las reacciones redox que se llevan a cabo como defensa contra el estrés oxidativo, reacciona rápida y no enzimáticamente con radicales OH^\cdot y con N_2O_3 y peroxinitrito, productos citotóxicos formados a partir de la reacción de óxido nítrico (NO) con O_2 y superóxido respectivamente, también participa en la detoxificación de peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos; cada una de estas reacciones conduce directa o indirectamente a la formación de glutatión oxidado o glutatión bisulfito (GSSG), este es reducido intracelularmente a GSH por la GSSG reductasa cuya reacción depende de NADPH. Se piensa que el enlace γ -peptídico protege a este tripéptido de la degradación por aminopeptidasas. En las células, tejidos y plasma, el glutatión se presenta en varias formas: Glutatión disulfido (GSSG) formado por la oxidación y también llamado Glutatión oxidado, pero además de productos de la oxidación otros productos se pueden formar, como ejemplo; sulfonatos y otros como GSSR, pero los principales son los glutatión-cisteinil disulfidos en las proteínas pues de esta manera las proteínas son glutatiónadas.⁶⁸

Figura 7.



Estructura química del glutatión

En condiciones normales existe una proporción $[GSH]/[GSSG] > 100$, sin embargo en situaciones donde existe un incremento significativo de estrés o si existen factores limitantes de la reacción de la GSSG reductasa (por ejemplo: la deficiencia en la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa lo que puede disminuir la disponibilidad de NADPH) provoca acumulación de GSSG teniendo como consecuencia dos factores: i) la pérdida de la proporción $[GSH]/[GSSG]$, llevando a la célula a la transcripción de elementos de respuesta oxidante y ii) el GSSG es preferentemente secretado de la célula lo cual incrementa la necesidad de sintetizar de novo GSH. El GSH se degrada en sus aminoácidos constitutivos mediante la vía γ -glutamil-transpeptidasa y cisteinil-glicina dipeptidasa. Principalmente la depleción del GSH está ligada a una gran variedad de enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.^{68,69}

En las células, el glutatión puede estar libre o unido a proteínas como se mencionó previamente, el glutatión libre se encuentra principalmente en su forma reducida, la cual puede pasar a su forma oxidada durante el estrés oxidativo y puede ser revertido por la acción de la enzima glutatión reductasa, el estatus redox depende del contenido relativo de la forma oxidada y reducida del glutatión y esta relación es crítica y determinante en la célula.⁶⁹

El decremento en el contenido de GSH en diabéticos puede ser causado por diferentes rutas incluyendo: 1) el incremento de la síntesis de sorbitol lo cual causa una depleción de NADH y la deficiencia de éste, limita la reducción del glutatión en forma oxidada catalizada por la glutatión reductasa. 2) la actividad de las enzimas involucradas en la vía de las pentosas fosfato, las cuales generan NADPH. 3) el GSSG puede atravesar la membrana del eritrocito debido al daño provocado en ésta generado por estrés oxidativo.^{70,71}

2.6.1. Síntesis y regulación del GSH

El GSH es sintetizado a partir de sus aminoácidos constituyentes con ayuda de las enzimas γ -glutailcisteína sintetasa (γ GCS) y la GSH sintetasa (GS) (Figura 8)

Es muy importante mantener el balance entre la síntesis y la pérdida de GSH; el nivel de GSH en la célula se mantiene constante en mayor parte gracias a su regeneración proveniente de la GSSG reductasa a partir de GSSG. En el caso de la hiperglucemia, este nivel disminuye rápidamente provocando con ello un aumento en el nivel de GSSG.

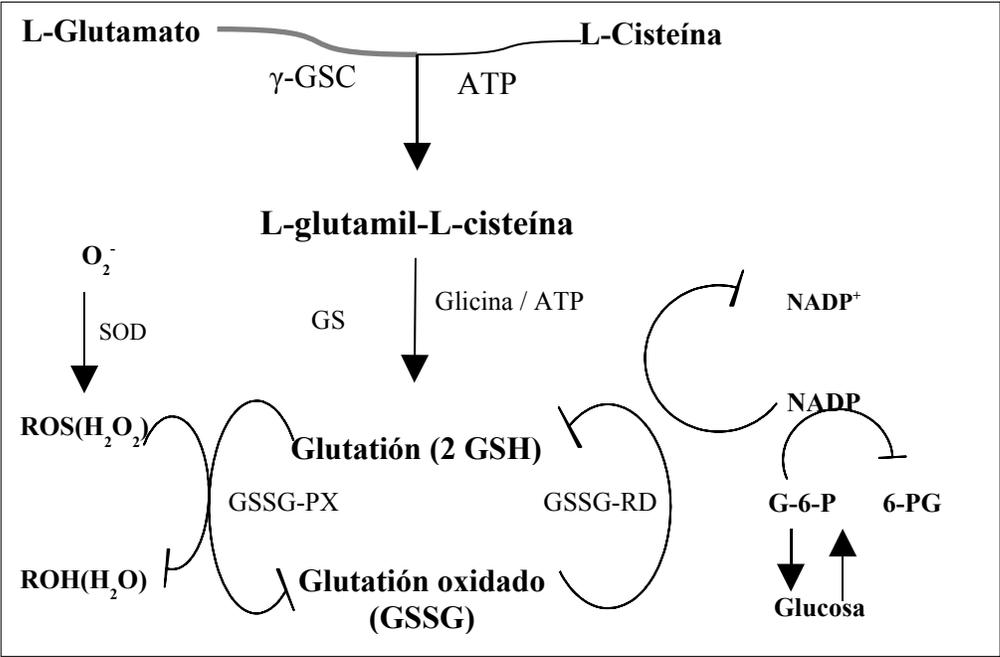
La síntesis de *novo* de GSH está regulada por lo menos por tres factores.^{68,69}

1 El nivel de γ GCS presente en la célula. La mayoría de las reacciones espontáneas o catalizadas que contribuyen a la pérdida de GSH intracelular son con electrófilos, muchos de ellos formados endógenamente por el sistema citocromo P450.

1 La disponibilidad de los sustratos. La concentración intracelular de GSH varía con el tejido y el estatus nutricional, pero no así los niveles de cisteína pues éstos son bajos comparados con los de glutamato y la glicina por la tanto la disponibilidad de cisteína limitan la síntesis de GSH.

2 La retroinhibición de GSH y γ GCS. En hiperglucemia podría darse otra de las causas por las que disminuye la síntesis de GSH: la inhibición de γ GCS debida a la fosforilación por proteínas cinasa (PKA y PKC) ya que pueden fosforilar residuos de serina y treonina de la subunidad pesada de γ GCS. El daño causado por la hiperglucemia puede incrementar esta fosforilación y con ello disminuir la eficiencia de los mecanismos de protección celular dependientes de GSH.⁷¹

Figura 8. Relación entre el Glutathión y algunas enzimas antioxidantes.



2.7. GLICINA

La glicina es un aminoácido no esencial, que se encuentra en muchos alimentos con un alto contenido de proteínas como el pescado, la carne, los frijoles y los productos lácteos. En el organismo puede ser sintetizado a partir de la serina la cual también es sintetizada endógenamente. Se sabe que la glicina de la dieta protege al organismo contra shock tanto por pérdida sanguínea como por endotoxinas, reduce la concentración de alcohol en el estómago y aumenta la recuperación de la hepatitis producida por alcohol, disminuye el daño hepático producido por fármacos hepatotóxicos y bloquea la apoptosis en riñón disminuye la nefrotoxicidad inducida por la ciclosporina A, que es un fármaco inmunosupresor, previene la hipoxia y la formación de radicales libres además de ser un neurotransmisor inhibitor en el sistema nervioso central.⁷²

Es el aminoácido más pequeño, carece de una cadena lateral significativa que pudiera impartirle limitaciones estructurales y por ello es parte importante en la estructura de ciertas proteínas ya que los residuos de glicina pueden acomodarse en el interior hidrofóbico de las proteínas lo cual les confiere flexibilidad en los pliegues para formar hélices. Péptidos con secuencias repetidas de glicina están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en las queratinas, en las proteínas filamentosas y en las laminillas nucleares.⁷²

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de la Glicina

IUPAC	ácido aminoetanoico
Fórmula química	$C_2H_5NO_2$
Masa molecular	$75,07 \text{ g mol}^{-1}$
Punto de fusión	535 K (se descompone)
Densidad	$1,607 \text{ g cm}^{-3}$
ΔH_c^0	$-981,1 \text{ kJ mol}^{-1}$
$\Delta_f H^0$	$-528,6 \text{ kJ mol}^{-1}$

2.7.1. Importancia de la glicina

Las funciones de la glicina se deben a su pequeño tamaño y a la falta de una cadena lateral significativa, que podría afectar a las características físicas de este aminoácido por impartir carga, hidrofobicidad u otras limitaciones estructurales. Estas propiedades permiten a la glicina desempeñar un papel importante en la estructura de ciertas proteínas y actuar en varias funciones celulares como un modificador biológico. El colágeno es rico en moléculas de glicina y ahora se sabe que la sustitución de un solo residuo de glicina por otro residuo dentro de la molécula de colágeno es la base de algunas enfermedades hereditarias como la osteogénesis imperfecta y la epidermólisis bulbosa pruriginosa.⁷³

La actividad biológica de algunas moléculas puede ser alterada por la adición o eliminación de un residuo de glicina. La conjugación con glicina es un importante mecanismo de detoxificación. Por ejemplo el retraso en el desarrollo de glicina N-acetiltransferasa en niños puede afectar a la detoxificación de varios fármacos y xenobióticos. La conjugación con glicina es también un importante proceso fisiológico, y la unión a ácidos biliares permite su paso a través de las membranas celulares. La α -amidación peptídica es necesaria para liberar algunas hormonas de sus precursores ricos en residuos de glicina. Este proceso postrasduccional terminal, es esencial para la activación biológica de muchas hormonas peptídicas, tales como gastrina y neuropéptidos. Sus funciones fisiológicas incluyen: regulación del volumen celular, estabilización del potencial de membrana, transducción de señales, transporte transepitelial y acidificación de orgánulos intracelulares.⁷⁴

2.7.2. La glicina como molécula de comunicación extracelular

Los canales iónicos tienen un papel clave en el mantenimiento de la integridad celular. Sus funciones fisiológicas incluyen: regulación del volumen celular, estabilización del potencial de membrana, transducción de señales, transporte transepitelial y acidificación de orgánulos intracelulares. El receptor de glicina es un complejo pentamérico que forma un canal transmembrana selectivo de cloro, que se expresa predominantemente en la médula espinal y el cerebro. En dichas regiones la glicina actúa como un neurotransmisor inhibitorio.⁷⁴

2.7.3. Receptores de la glicina

La glicina ejerce su acción inhibitora por unión a su receptor que está ampliamente localizado en las membranas neuronales postsinápticas. La señal inhibitora postsináptica, bloquea la acción despolarizadora de la neurotransmisión por incremento de la permeabilidad al Cl^- a través de la membrana neuronal postsináptica. Igualmente se ha demostrado que una amplia variedad de células involucradas en la inflamación (células de Kupffer, macrófagos alveolares y neutrófilos) también contienen canales de cloro sensibles a glicina. La glicina provoca por hiperpolarización de la membrana plasmática de leucocitos una menor sensibilidad a los estímulos inflamatorios tales como endotoxinas y posiblemente a una amplia variedad de factores de crecimiento. Con la producción de estímulos externos tales como endotoxinas, se produce un influjo dependiente de voltaje de calcio libre extracelular a través de canales dependientes de voltaje. Este incremento en el calcio intracelular es impedido debido al estado de hiperpolarización de la membrana plasmática creado por la interacción de la glicina con su receptor. De esta manera se bloquea la producción de señales intracelulares y la producción de citocinas que son dependientes del incremento del calcio intracelular, lo que previene la cascada de producción de citocinas inflamatorias que sigue a la activación de las células de Kupffer y otros tipos de células sanguíneas que contengan este tipo de receptor.^{74, 75}

2.7.4. La glicina como antioxidante

El estrés oxidativo puede afectar a la integridad celular sólo cuando los mecanismos antioxidantes no son capaces de superar la generación de radicales libres. Dicho estrés induce un incremento en la permeabilidad y un descenso en el potencial de membrana. El efecto de la glicina sobre las actividades de las enzimas antioxidantes, podría derivar del bloqueo ejercido por este aminoácido sobre la activación de las células de Kupffer, productoras de radicales libres tanto de oxígeno como de nitrógeno y de citocinas, cuyas concentraciones se incrementarían en condiciones de daño por isquemia/reperfusión provocado por shock hemorrágico agudo. Dicho bloqueo impediría la actuación de estos factores sobre las enzimas antioxidantes, con la restauración de valores próximos a controles, tanto de la actividad como de los ARNm, de dichas enzimas.⁷⁴

2.7.5. La glicina como antiinflamatorio

Las células de Kupffer del hígado constituyen el 80% de los macrófagos residentes en el organismo. La glicina bloquea el proceso inflamatorio sistémico que se origina en una amplia variedad de estados patológicos tales como trauma, shock hemorrágico, sepsis, quemaduras, debido a la activación de macrófagos que liberan potentes mediadores inflamatorios tales como citocinas tóxicas y eicosanoides, los cuales desempeñan un importante papel en la respuesta inflamatoria. La glicina ha mostrado ser benéfica en diferentes condiciones patológicas que involucran estrés oxidativo, puede disminuir la generación de los radicales libres por su participación en la biosíntesis del glutatión. **La glicina reduce los niveles de hemoglobina glucosilada y coadyuva al retraso y disminución de las complicaciones asociadas a la diabetes tipo 2**, como el síndrome del pie diabético, daños renales, en la retina o los vasos sanguíneos, entre otros. La glicina evita que la glucosa se adhiera a las proteínas, y así favorece la disminución de los niveles de ésta y en las proteínas de larga vida reduce la formación de productos de glicación avanzada, además de coadyuvar a la producción de insulina. Los pacientes con diabetes presentan un elevado nivel de hemoglobina glucosilada, como resultado del exceso de glucosa circulante que se adhiere a la hemoglobina HbA1c, en pacientes con diabetes se encuentran niveles superiores a lo deseable (más de 5 por ciento de la hemoglobina del organismo).^{74,75}

2.7.6. Glicina y óxido nítrico

Se ha relacionado al óxido nítrico (NO), un mediador biológico de vida media corta plasmática, producido por diversos tipos celulares tales como células inflamatorias y hepáticas, tanto con el mecanismo de señales moleculares como con distintas patologías derivadas de sus efectos tóxicos. Se han descrito tanto efectos benéficos como perjudiciales al inhibir su formación. Existe un consenso generalizado según el cual la excesiva producción de NO es citotóxica y contribuye al daño celular en distintos estados patológicos, incluyendo daño pulmonar agudo, shock endotóxico y daño producido por los fenómenos de isquemia/ reperfusión. En condiciones fisiológicas el NO liberado de las células del endotelio vascular a través de la NOS constitutiva (ecNOS), regula el tono

vascular, la presión sanguínea y la perfusión tisular. En diferentes condiciones patológicas, sin embargo, la forma inducible de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) puede producir grandes cantidades de NO que están implicadas en la inducción de daño celular y disfunción orgánica. Es posible que este aumento en la formación de NO esté involucrado en la descompensación vascular, el fallo orgánico y la fisiopatología de la respuesta inflamatoria sistémica. Todo esto nos lleva a establecer una relación entre el aumento de las especies reactivas de oxígeno, el incremento en la producción del TNF- α y la producción de NO derivado del aumento en la expresión de la iNOS. Se podría sugerir que el aminoácido glicina impide el efecto tóxico derivado del incremento de la concentración de NO al bloquear tanto la producción de radicales libres como la producción de citocinas inflamatorias, factores que favorecen la producción de NO derivado de la iNOS. ^{72,74}

2.7.7. Glicina y factores de transcripción

En las células eucariotas la expresión de los genes está controlada por los factores de transcripción. La actividad de las proteínas que pueden unirse al ADN, como c-Jun, c-Fos o la familia Rel/NF- κ B regulan la actividad transcripcional de los genes de las citocinas. La gran mayoría de los genes que codifican para citocinas que participan en la respuesta inflamatoria tienen sitios κ B en sus regiones promotoras. El factor nuclear- κ B (NF- κ B) es un factor transcripcional identificado inicialmente como una proteína de origen linfocitario, que se une al oligonucleótido GGGACTTTCC presente en muchos genes. Modificaciones en el NF- κ B/Rel/I κ B dan lugar a la activación de NF- κ B. El papel de NF- κ B está relacionado con la respuesta inflamatoria y desempeña un papel importante en la activación de las células hepáticas estrelladas. Se ha sugerido un papel antiapoptótico de NF- κ B. Las vías de activación de NF- κ B son extremadamente sensibles a los cambios en el estado oxidativo celular. Las especies reactivas de oxígeno generadas en condiciones de shock hemorrágico activan factores reguladores nucleares como NF- κ B que afecta a la transcripción de genes de citocinas. La glicina administrada bien por vía oral o en inyección inhibe la activación del factor transcripcional NF- κ B, que podría deberse no a un efecto directo sobre NF- κ B sino más bien al bloqueo o disminución de diversos factores que podrían inducir su estimulación, y

que se pueden relacionar con alteraciones redox celulares como son las ERO, el NO y el TNF- α .⁷⁴

2.7.8. Mecanismo de acción de la glicina

Ya que la glicina es uno de los aminoácidos que desciende en suero en el shock, el papel inmunorregulador de la glicina puede ser muy importante. La dieta con glicina permite incrementar la concentración sanguínea de glicina a más de 1 mM desde concentraciones de 0,1-0,2 mM y proteger contra el shock causado por disminución sanguínea o endotoxinas. Probablemente la glicina tenga efectos inhibidores en mecanismos de comunicación celular, en células que contengan un canal de cloro sensible a glicina. Los canales de calcio sensibles al voltaje cumplen una función primordial en la elevación del calcio, necesario para los mecanismos de acción intracelular en muchos tipos celulares inmunes como las células de Kupffer. Además, es conocido que incrementos en el Ca²⁺ intracelular disparan la apertura de canales de cloro en la membrana plasmática, conduciendo a la hiperpolarización, haciendo más difícil la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. Con la apertura de los canales de cloro en la membrana plasmática de las células de Kupffer y otras células sanguíneas blancas, se dificulta o impide el influjo de calcio disparado por una variedad de agonistas, medicamentos y factores de crecimiento. Así, muchos otros estados patológicos que involucran activación de células inmunes, en particular macrófagos, neutrófilos y linfocitos, deberían estar afectados por elevados niveles de glicina, de acuerdo con esta hipótesis. Además, la elevación de los niveles sanguíneos de glicina, con una simple administración dietaria, ha demostrado mejorar entre otros la situación en daño hepático por alcoholismo, algunas formas de cáncer, y la nefrotoxicidad debida a ciertos medicamentos.⁷⁴

2.7.9. Glicina y diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa que afecta a cerca del 10% de la población de nuestro país y que constituye la tercera causa de mortalidad. La esperanza de vida de los mexicanos se ha incrementado progresivamente. Si en 1940 era de 41 años, se elevó a 53 años en 1953 y a 70 años en 1990. En 1997, llegó a 74 años. En 1981, se sugirió explicar los daños

crónicos producidos por la diabetes mediante mecanismos bioquímico-moleculares. Se pudo observar que estos daños son similares a los que produce el envejecimiento, al grado que se consideró la diabetes mellitus como una forma de envejecimiento acelerado. De igual forma, las causas de muerte, mencionadas arriba, debido a la diabetes y a la vejez son las mismas, así como los mecanismos bioquímico-moleculares que explican los daños ocasionados por la enfermedad o el envejecimiento. Estos mecanismos se presentan en las figuras 9 y 10 en donde se considera que la glicosilación no enzimática de las proteínas (glicación) conduce a la formación de una gran variedad de productos, denominados genéricamente “AGEs” (“Advanced Glycosylation End products”), que son los principales responsables de los daños vasculares, neurológicos, inmunológicos, etc.^{75, 76}

De acuerdo con lo anterior, se pensó en la posibilidad de evitar la glicación de las proteínas con la administración de dosis relativamente altas del aminoácido glicina que pudiera proteger las proteínas, se glicosilará en vez de ellas y se metabolizará.

Se eligió la glicina porque ya se está utilizando, en dosis de hasta 30 gramos/día durante varios meses, sin observarse efectos secundarios indeseables. Las glicosil-proteínas sufren un conjunto muy variado de reacciones (que requieren días o semanas) para dar los AGEs. Estos AGEs encaminan hacia la producción de los daños de la diabetes y el envejecimiento. La glicina tendría el efecto de prevenir la glicación inicial y en consecuencia detener la formación de los AGEs en una gran proporción si no en su totalidad.

Figura 9. Glicación enzimática de proteínas.⁷⁵

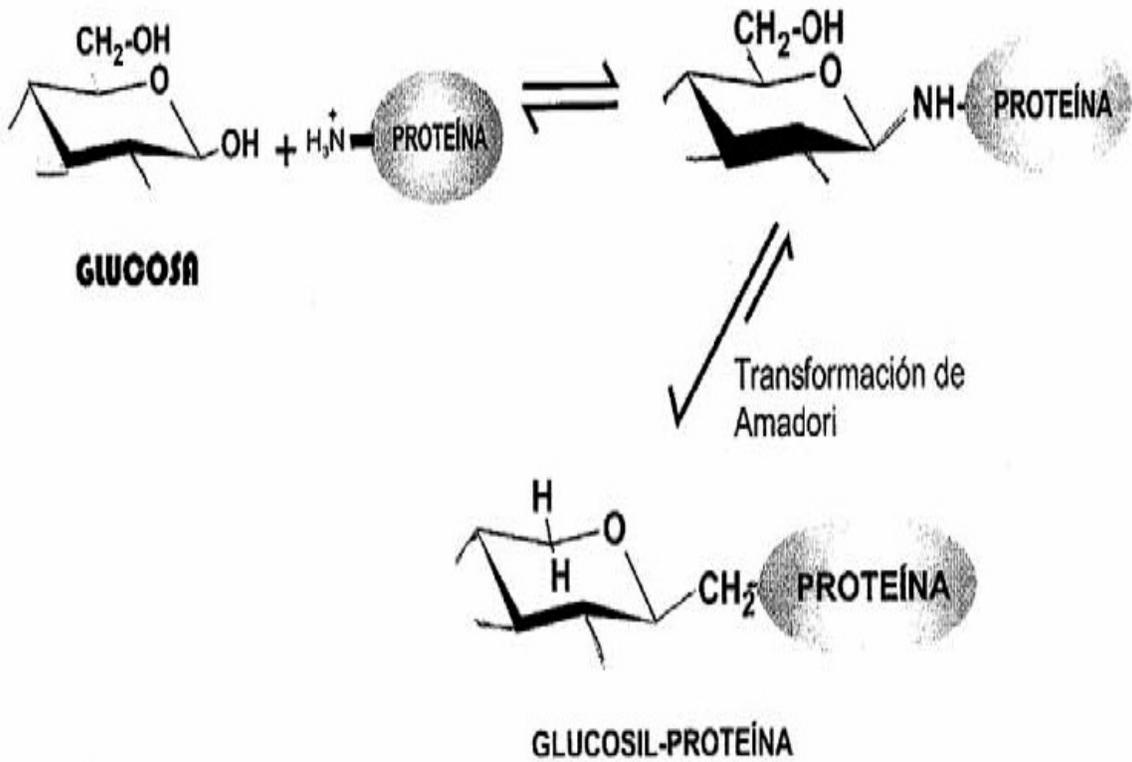
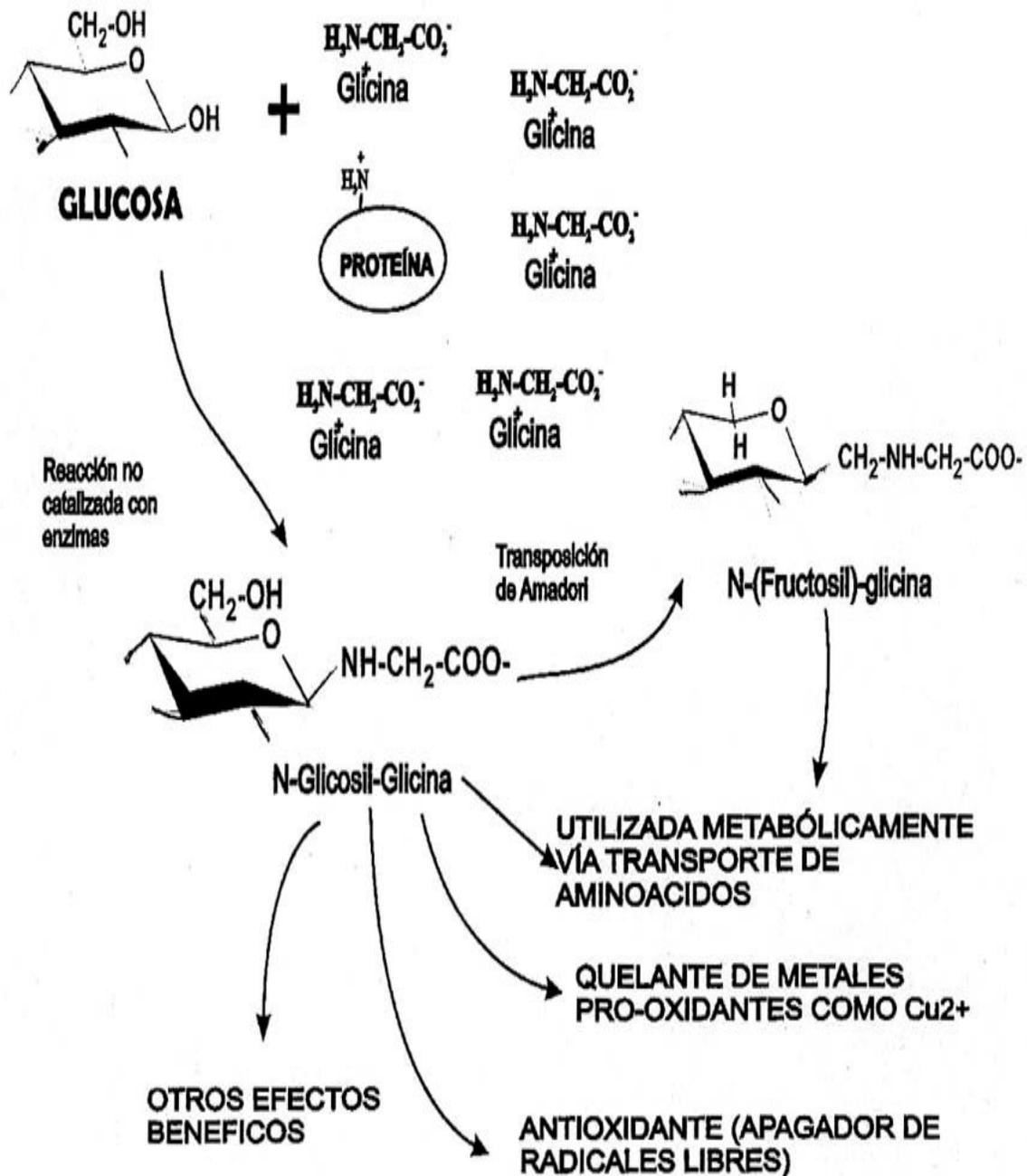


Figura 10. Protección de la glicina contra la glicación.⁷⁵



2.8. EL ERITROCITO

Los glóbulos rojos, también denominados eritrocitos o hematíes son los elementos formes cuantitativamente mas numerosos de la sangre. Constituyen el componente principal que usan los vertebrados para transportar oxígeno por medio de la hemoglobina a través de la sangre y los vasos sanguíneos hacia los diferentes tejidos del cuerpo. El nombre eritrocito deriva del griego *erythros* (rojo) y *kytos* (hueco), pues el eritrocito es un disco bicóncavo de aproximadamente 7.5 μm y de 80 a 100 fL de volumen. La formación de eritrocitos se denomina eritropoyesis y constituye un sistema de renovación continua, es decir que sus elementos celulares poseen vida media limitada por lo cual deben ser reemplazados en forma periódica en la medula ósea de los huesos largos. A medida que la célula madura el núcleo paulatinamente se vuelve picnótico y es forzado hacia afuera de la célula en la etapa ortocromática. La membrana del eritrocito es un complejo bilípidico-proteínico, el cual es importante para mantener la deformabilidad celular y permeabilidad selectiva. La vida promedio del eritrocito normal es de 100 a 120 días, la concentración eritrocitaria varía de acuerdo al sexo, edad, ubicación geográfica. En condiciones normales la producción de eritrocitos constituye una magnitud constante: alrededor de 30 ml por kilogramo de peso, el proceso de eritropoyesis en el ser humano demora entre 5 y 6 días y es controlado por la hormona denominada eritropoyetina.

2.8.1. Alteraciones del sistema eritrocitario

Las alteraciones que afectan a los eritrocitos pueden ser clasificadas en dos grandes grupos, teniendo en cuenta sus manifestaciones clínicas más características (Tabla 6)⁷⁸.

Las deficiencias en algunas enzimas de algunas rutas metabólicas originan enzimopatías, pues ya que carecen de núcleo y ciertos orgánulos celulares, no son capaces de compensar este defecto enzimático mediante la síntesis de estas enzimas. Seis enzimopatías de la ruta glucolítica y una en la de las pentosas fosfato causan anemias hemolíticas.⁷⁸ (Tabla 7)

Tabla 6. Clasificación de las alteraciones en los eritrocitos

Clasificación	Características	Tipos
<i>Anemias</i>	Reducción del número de eritrocitos, de la concentración de hemoglobina o del valor de hematocrito	Por pérdida de sangre, disfunción de la médula ósea, esferocitosis o eliptocitosis hereditarias, por deficiencia de vitamina B12, de ácido fólico y/o hierro y por enfermedades endocrinas, gastrointestinales o hepáticas
		Hemolíticas, por diferentes alteraciones en los eritrocitos principalmente hereditarias
<i>Policitemias</i>	Elevación en el número de eritrocitos.	

Tabla 7. Enzimopatías hemolíticas

Enzima deficiente	Ruta metabólica	Manifestaciones
Hexocinasa HK	Glucolítica	Conduce a bajos niveles de 2,3 bifosfoglicerato y consecuentemente a un aumento de la afinidad por oxígeno de la hemoglobina.
Fosfoglucosa isomerasa GPI	Glucolítica	Anemia hemolítica, retardo mental e hipotonía muscular, agravado por estrés oxidativo
Fosfofructocinasa PKF	Glucolítica	Miopatía, desorden denominado de tipo VII de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno.
Aldolasa ADL	Glucolítica	Anemia moderada, aumento de fructosa 1,6 bifosfato e infecciones en el tracto respiratorio,
triosafosfato isomerasa TPI	Glucolítica	Anemia hemolítica, anomalías neuromusculares y complicaciones cardíacas.
Fosfoglicerato cinasa PGK	Glucolítica	Anemia hemolítica, alteraciones neurológicas y retardo mental
Piruvatocinasa PK Glucosa -6-fosfato deshidrogenasa G6PDH	Embden-Meyerhof	Anemia hemolítica crónica, bajos niveles de ADP y altos niveles de 2,3-bifosfoglicerato. Disminuye la proporción de GSSG/GSH
γ -glutamyl-cisteinil sintasa γ -GCS	Síntesis de glutatión	Hemólisis y defectos neurológicos

2.8. 2. Metabolismo energético de los eritrocitos

El metabolismo de los eritrocitos es limitado debido a la ausencia de núcleo, mitocondria y otros organelos, la principal fuente energía metabólica proviene de la glucosa la cual se metaboliza a través de la vía glucolítica y de la ruta de hexosas monofosfato (Figura 11).

- Vía glucolítica. La glucosa se cataboliza anaerómicamente a piruvato o lactato, que representan los productos finales del metabolismo en el eritrocito. Proporciona ATP para la regulación de la concentración intracelular de cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}).
- Ciclo de las hexosas monofosfato: esta vía proporciona NADPH y glutatión para reducir oxidantes celulares. Aproximadamente 5% de la glucosa celular ingresa a esta vía (Figura 12).

Figura 11. Relación entre el ciclo del glutatión y las hexosas monofosfato

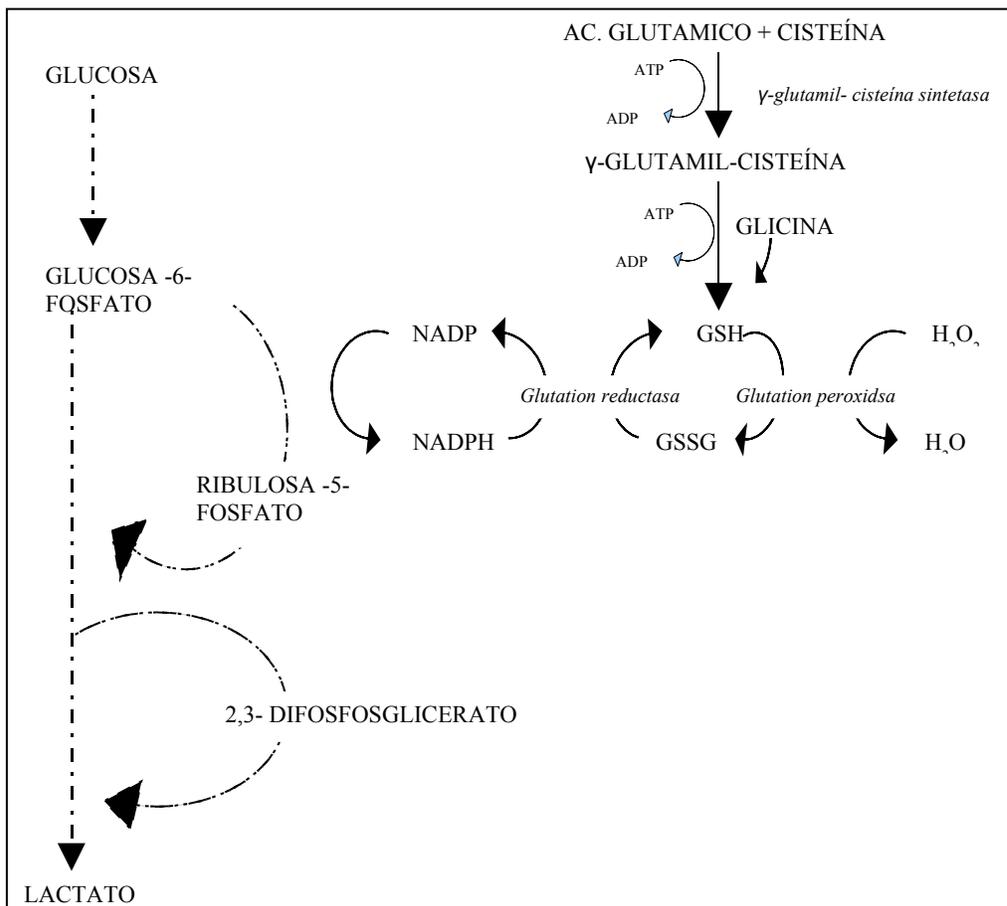
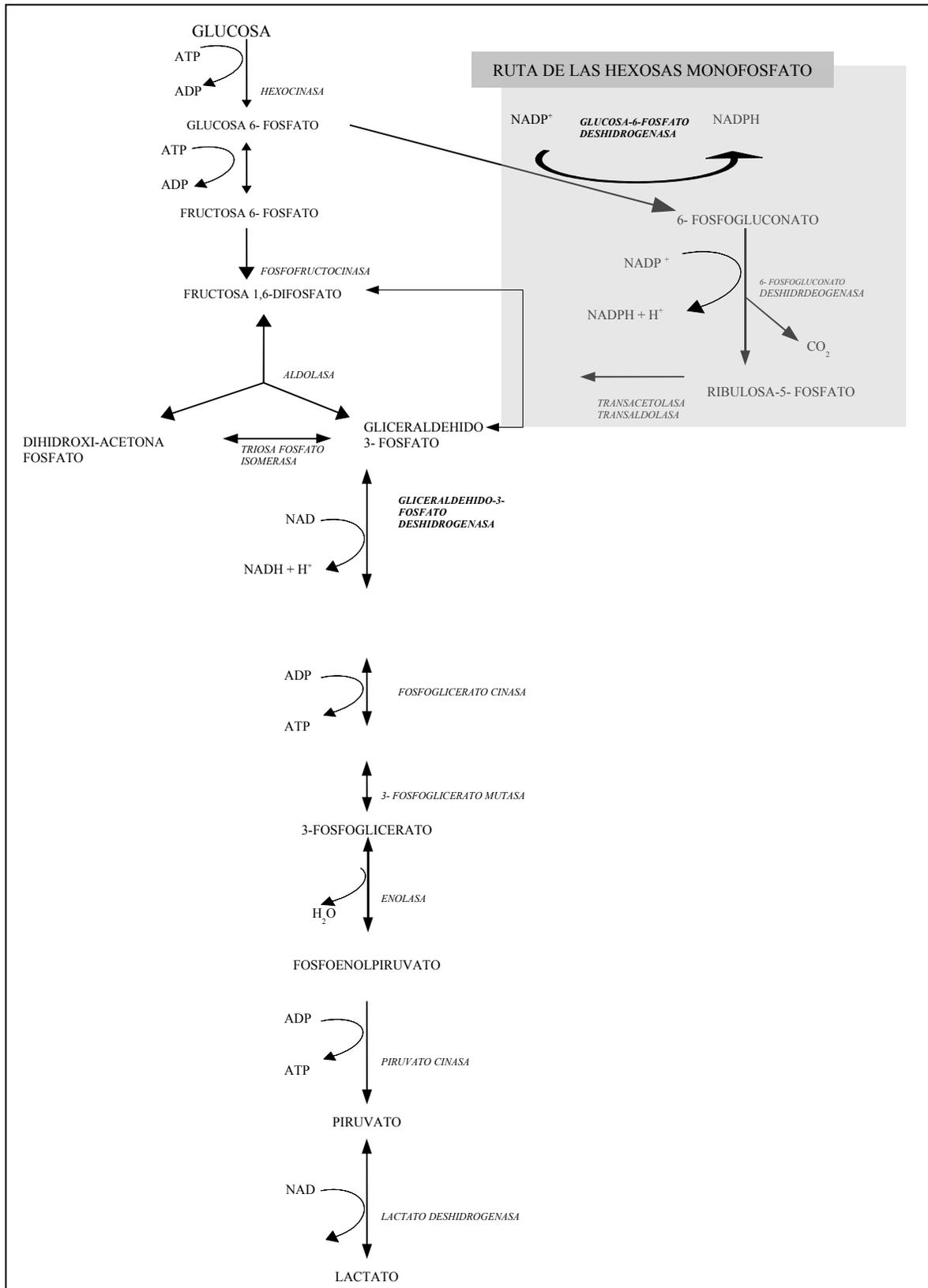


FIGURA 12. Principales vías glucolíticas en el eritrocito



3. MATERIAL Y METODOS

3.1. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Todos los productos químicos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St.Louis, Missouri, USA). Los reactivos para las determinaciones de los parámetros bioquímicos se obtuvieron de las casas comerciales ITC Diagnostics (Barcelona, España), Intrumentation Laboratory (Milano, Italia) y de Biokit, S.A. (Barcelona, España). Los suplementos administrados a los participantes fueron: glicina de la casa comercial Vita Drog, S.A. de C.V. (D.F, México) y almidón de papa placebo Química Mayer (D.F, México).

3.2. APARATOS E INSTRUMENTAL

-*Centrifugas*. Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en la centrífuga HETTICH Zentrifugen (Rotina 46 r). Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en la centrífuga refrigerada Beckman Coulter.

-*Espectrofotómetro*. Las determinaciones de las cinéticas enzimáticas se realizaron en el espectrofotómetro Beckman .

-*Balanza*. De precisión Sartorius BP 210 S.

3.3. PACIENTES

Se realizó un estudio longitudinal, aplicado a salud pública. El universo de estudio estuvo constituido por 60 pacientes con diagnóstico de diabetes tipo 2 que acuden al Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Los criterios de selección aplicados a los participantes fueron los siguientes:

Inclusión

- a) Pacientes de ambos sexos (36 mujeres, 29 hombres).
- b) Edad comprendida entre los 57 y los 67 años.
- c) No menos de 5 años de padecimiento de la enfermedad.
- d) Sin enfermedades agregadas al mismo.
- e) No presentar complicaciones tardías propias de la enfermedad.

Exclusión

- a) Aquellos que por causas diversas no se adhieran al tratamiento.

3.4. TRATAMIENTOS

Los participantes fueron clasificados en forma aleatoria para conformar dos grupos: Grupo 1, integrado por 30 pacientes, los cuales recibieron 15g de glicina repartidos en tres dosis diarias disueltas en agua, que fueron ingeridas después de los alimentos. Grupo 2, incluyó 30 pacientes a los cuales se les administró 15g de placebo (almidón de papa) repartidos en tres dosis y con las mismas indicaciones que para el grupo 1. Ambos grupos estuvieron sujetos a los tratamientos durante tres meses consecutivos. Antes y después de los tratamientos se les determinó los parámetros antropométricos, las pruebas de gabinete clínico, así como las determinaciones de hemoglobina total, contenido de GSH, y las actividades de G6PDH y GAPDH en el eritrocito.

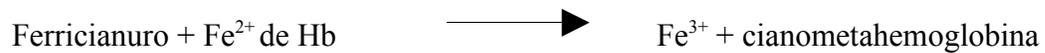
3.5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Al inicio y final de los tratamientos, de cada participante en ayuno se obtuvo una muestra de sangre en tubos con heparina mediante punción venosa con el sistema de vacutainer. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se guardó a -70 °C y el paquete celular se resuspendió en solución fisiológica y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, para el lavado de los eritrocitos, este procedimiento se repitió tres veces. Una vez concluidos los lavados el paquete celular se llevó a un volumen de 6 mL con agua bidestilada agitando vigorosamente, posteriormente se colocó en baño de hielo

durante 30 minutos. Una vez concluido el tratamiento los lisados fueron almacenados a – 20 °C hasta su uso.

3.5.1. *Determinación de hemoglobina total*

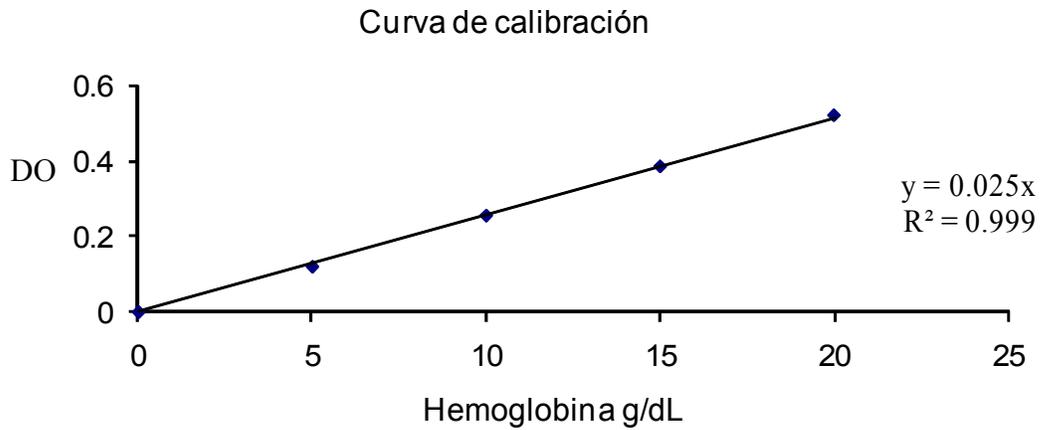
Para la cuantificación de hemoglobina se utilizó el método basado en la fórmula de Drabkin, en donde se empleó una solución de ferricianuro y cianuro potásico. El principio de la determinación se basa en que el ferrocianuro convierte al hierro ferroso de la hemoglobina en hierro férrico, para formar cianometahemoglobina



Para determinar la concentración de hemoglobina de las muestras primero se realiza una curva de calibración, la cual se preparó diluyendo el estándar de concentración 80 mg/dL con el reactivo Drabkin y midiendo la absorbancia de cada dilución a 540 nm.

No de tubo	1	2	3	4	5
Estándar (mL)	0.0	1.25	2.5	3.75	5.0
Reactivo Drabkin (mL)	5.0	3.75	2.5	1.25	0.0
Concentración de hemoglobina (g /dL)	0	5	10	15	20

Figura 13. Curva de calibración de hemoglobina

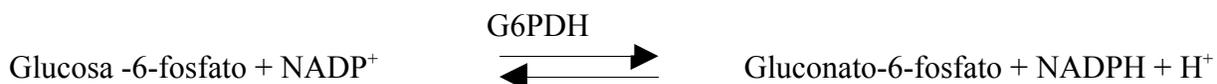


Una vez realizada la curva de calibración, se diluyeron 0.02 mL de muestra con 5.0 mL del reactivo, se mezcló bien y se esperaron 3 minutos para después medir la densidad óptica de la solución resultante de cianometahemoglobina contra blanco de reactivos a 540 nm y la concentración de hemoglobina en la muestra se leyó directamente en la curva de calibración previamente realizada ya que no se tienen que realizar cálculos de conversión del estándar. Valores de referencia (g/dL): Hombres 13-18; Mujeres 11-16

3.5.2. Determinación de la actividad enzimática de G6PDH

Se prepararon los lisados de paquetes globulares y en los sobrenadantes se cuantificaron las actividades para la G6PDH los cuales se analizaron por el método Rudack y colaboradores (1971); el cual determina la actividad mediante la producción de NADPH.

Las actividades se expresan en mU/mg de proteína en las condiciones del ensayo. Una mU es igual a un nmol de NADPH producido por minuto. Las reacciones enzimáticas se especifican a continuación.



MÉTODO

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

2.59 ml de amortiguador de trietanolamina 0.1M pH= 7.6	86.3 mM
0.20 ml de Glucosa-6- fosfato 35 mM	1.2 mM
0.10 ml de solución de NADP aprox. 11mM	0.37 mM
0.20 ml de solución de MgCl ₂ 0.1M	6.7 mM
0.01 ml de muestra	_____

Se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro DU-*64 Beckman a una longitud de onda de 340 nm, antes de agregar la muestra se leyó un blanco de reactivos el cual indica la confiabilidad del sistema. A continuación se agregó la muestra tomando la lectura de densidad óptica desde tiempo cero cada minuto durante 5 minutos.

3.5.3. *Determinación de la actividad enzimática de GAPDH*

Se prepararon los lisados de paquetes globulares y en los sobrenadantes se cuantificaron las actividades para la GAPDH; el cual determina la actividad mediante el consumo de NADPH.

Las actividades se expresan en mU/mg de proteína en las condiciones del ensayo. Una mU es igual a un nmol de NADPH producido por minuto.

MÉTODO

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

2.47 ml de amortiguador de trietanolamina 0.1M pH= 7.6	83.2 mM
0.10 ml de solución de ATP aprox. 32mM	1.1 mM
0.20 ml de Glicerato 3-fosfato 93 mM	6.2 mM
0.05 ml de solución de NADH aprox. 12mM	0.2 mM
0.10 ml de solución de EDTA 26mM	0.9 mM
0.06 ml de solución de MgSO ₄ 0.1M	2 mM
0.01 ml de suspensión de PGK aprox. 400 U/mg	aprox. 13 U/ml.
0.01 ml de muestra	_____

Se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro DU-*64 Beckman a una longitud de onda de 340 nm, antes de agregar la muestra se leyó un blanco de reactivos el cual indica la confiabilidad del sistema. A continuación se agregó la muestra tomando la lectura de densidad óptica desde tiempo cero cada minuto durante 5 minutos.

CÁLCULOS

Para obtener las actividades enzimáticas se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Actividad por volumen} = \frac{3.0}{\epsilon_{340} * 1.0 * 0.01} * \frac{\Delta E}{\text{min.}} = [\text{U} / \text{ml de muestra}]$$

Donde: 3.0 = el volumen final de la celda [cm³]

ϵ_{340} = 6.22 [cm²/μmol] coeficiente de extinción a 340 nm

1.0 = paso de luz por la celda [cm]

0.01= volumen de la muestra [ml]

ΔE = cambio en la densidad óptica [min⁻¹]

3.5.4. Determinación de la concentración de GSH

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad por volumen}}{\text{Concentración de hemoglobina total (g de Hb / ml)}} = [\text{U} / \text{g de proteína}]$$

Se utilizaron lisados de paquete globular con agua destilada para poder determinar la concentración de glutatión de las muestras. Primero se realizó una curva estándar, la cual se preparó con una solución de GSH con una concentración final de 6.14mg/10 ml. Se realizó la siguiente mezcla de reacción para cada muestra:

1.0 mL de lisado de eritrocitos

0.50 mL de ácido sulfosalícilico al 10% p/v

Esta mezcla de reacción se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min, para tomar en otro tubo:

0.20 mL del sobrenadante de la mezcla centrifugada

0.80 mL de ASS

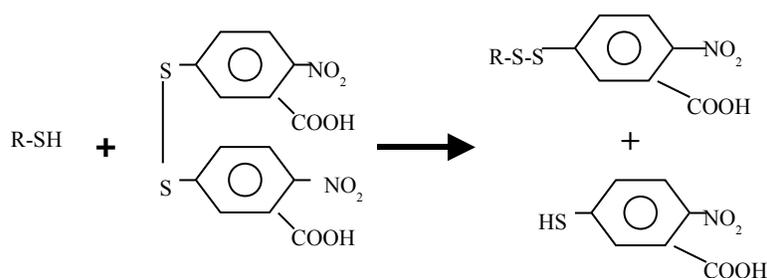
2.0 ml de TRIS

0.05 mL de DTMB preparado al momento

Se leyeron las muestras a una longitud de onda de 412 nm contra blanco de reactivos y se extrapolaron en la curva estándar para obtener el resultado (R1)

El fundamento del ensayo se basa en la formación de un producto de sustitución (tioéteres) con los mercaptanos presentes en la muestra y posteriormente se lleva a cabo una β eliminación en presencia del DTMB el cual transforma específicamente el producto de sustitución con el GSH en un cromóforo que tiene una densidad óptica máxima a 412nm.

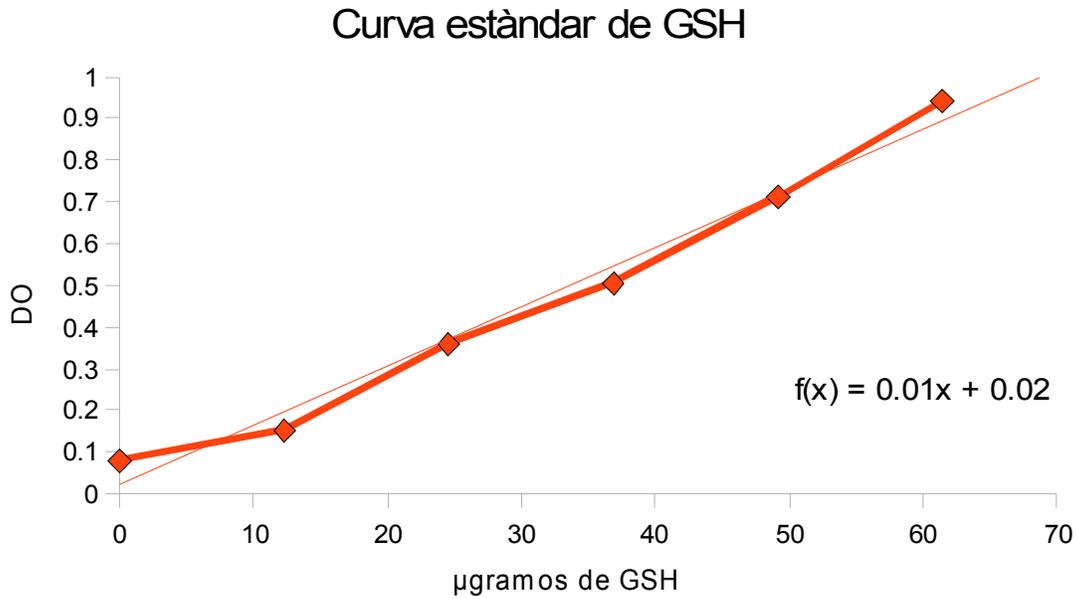
Sistema de reacción:



Para la curva estándar:

Dilución	Solución	Concentración	ASS	TRIS	DTMB	DO
n	estándar	μg	μL	ml	μL	
	μL					
1	20	12.28	980	2	50	0.153
2	40	24.56	960	2	50	0.360
3	60	36.84	940	2	50	0.505
4	80	49.12	920	2	50	0.712
5	100	61.40	900	2	50	0.941
blanco	0	0	1000	2	50	0.080

Figura 14. Curva estándar de Glutati6n.



CÁLCULOS

$$\frac{R1 [\mu\text{mg de GSG}]}{200\mu\text{L}} * \frac{6000\mu\text{L}}{\text{mL de sangre total}} = \mu\text{mg de GSH/ ml de sangre total (R2)}$$

$$\frac{R2}{307.3 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} = \mu\text{mol de GSH/ ml de sangre total (R3)}$$

$$\frac{\mu\text{mol de GSH/ ml de sangre total (R3)}}{\text{Conc. de hemoglobina en muestra (g/ml)}} = \mu\text{mol de GSH/ g de Hb}$$

3.5.5. *Análisis estadístico*

La evaluación estadística de las actividades de G6PDH y GAPDH y la concentración de GSH se realizó con la prueba de ANOVA; considerando estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características antropométricas generales.

En la Tabla 8 se presentan la media y desviación estándar de las características clínicas: edad, peso, talla, IMC, ICC de los participantes que integraron los grupos de glicina y placebo. Estas características no sufrieron ninguna modificación durante el tratamiento de glicina y placebo al cual fueron sometidos y no mostraron cambios al final del tratamiento

Tabla 8. Perfil fisiológico de los pacientes

Promedios	Glicina		Placebo	
	Hombres 15	Mujeres 15	Hombres 15	Mujeres 15
Edad	57 años \pm 10.0	56 años \pm 9.6	56 años \pm 9.9	56años \pm 9.6
Talla	1.58 m \pm 0.1	1.58 m \pm 0.09	1.59 m \pm 0.09	1.57m \pm 0.09
Peso	71.67 Kg \pm 11.2	71.46 Kg \pm 11.5	71.35 Kg \pm 11.4	71.25 Kg \pm 11.5
IMC	28.24 \pm 3.64	28.3 \pm 4.04	28.03 \pm 3.83	28.39 \pm 4.06
ICC	0.90 \pm 0.06	0.90 \pm 0.06	0.90 \pm 0.06	0.90 \pm 0.06

En la Tabla 9 se presentan las medias y desviación estándar de las características metabólicas al inicio y final del tratamiento para cada grupo. En ambos grupos no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros bioquímicos.

Tabla 9. Perfil bioquímico de los pacientes

Parámetro	Glicina		Placebo	
	T ₀	T _{3MESES}	T ₀	T _{3MESES}
Glucosa (mg/dL)	161.1 ± 52.81	160.3 ± 37	151.3± 57.87	146.3 ± 48.83
HbA1c (%)	8.6 ±1.99	7.1 ±1.49	8 ± 1.67	6.8± 1.49
Insulina (UI)	14.3 ± 5.53	13.5 ± 5.28	14.0± 7.78	14.5 ± 7.64
Colesterol (mg/dL)	196.2 ±	199.1±	204.5± 37	206.2 ± 49.26
LDL (mg/dL)	113.3 ± 32.51	114.4 ± 28.54	120.1 ± 27.8	125.3 ± 42.91
HDL (mg/dL)	41.2 ± 11.49	38.9± 13.86	44.3 ± 12.3	41.9 ± 12
TG (mg/dL)	228.6± 110.87	226.8 ±126.08	210.9 ± 117.9	205.7 ± 130.89

El metabolismo eritrocitario depende de la vía de la glucólisis como principal fuente de energía, a través de ella se genera los equivalentes reductores en forma de NADH, los cuales mantienen al grupo Hemo de la hemoglobina en estado funcional (Fe^{2+}), evitando así la formación de metaHb(Fe^{3+}). La enzima glucolítica involucrada en la formación de NADH es GAPDH, en condiciones altas de glucosa su actividad se ve alterada. En el presente estudio la actividad de GAPDH en los hematíes de los pacientes diabéticos tipo 2 entre los grupos tratados con glicina y placebo no mostraron diferencias significativas; ni tampoco al analizar por grupos al inicio y término del tratamiento (Figura 15).

En el eritrocito, un 10 % de la glucosa se deriva a la vía de las pentosas y el 90 % se utiliza como fuente de energía mediante la glicólisis. La importancia biológica de la vía en los eritrocitos es evitar su hemólisis mediante el aporte del NADPH necesario para conservar el GSH, que a su vez constituye el sustrato para la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa; ambas involucradas en metabolizar al H_2O_2 y mantener al GSH, respectivamente. La fuente principal de NAPH es la G6PDH.

La actividad de la G6PDH entre los grupos tratados con glicina y placebo no mostró diferencias significativas. Sin embargo, al considerar el análisis estadístico por grupo al inicio

y al término del tratamiento sí mostró aumentos significativos de 2 y 1.7 veces para glicina y placebo, respectivamente (Figura 16).

El contenido de GSH mostró el mismo patrón observado para la enzima G6PDH. El grupo tratado con glicina no mostró diferencias significativas con respecto al placebo. Sin embargo, el grupo que recibió glicina al comparar al inicio y al término del tratamiento mostró un incremento significativo de 1.96 veces. No obstante que el grupo placebo mostró tendencia de incremento ésta no mostró diferencias significativas (Figura 17).

Figura 15. La gráfica representa la actividad de GAPDH en eritrocitos de pacientes diabéticos tipo 2. Los valores representan la media \pm la desviación estándar comparado con la actividad inicial

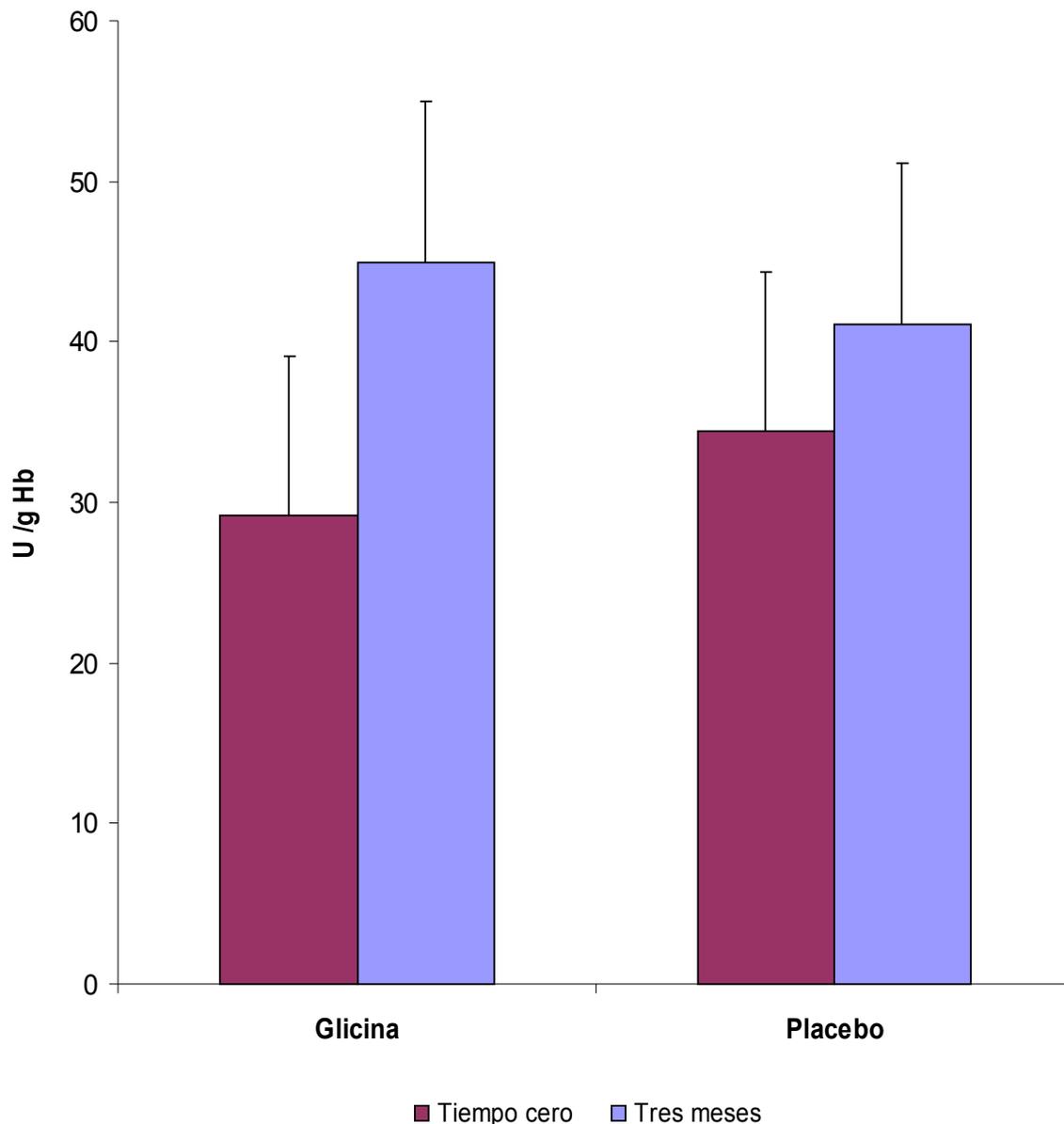


Figura 16. La gráfica representa la actividad de G6PDH en eritrocitos de pacientes diabéticos tipo 2. Los valores representan la media \pm la desviación estándar comparado con la actividad inicial. (* $p \leq 0.0001$)

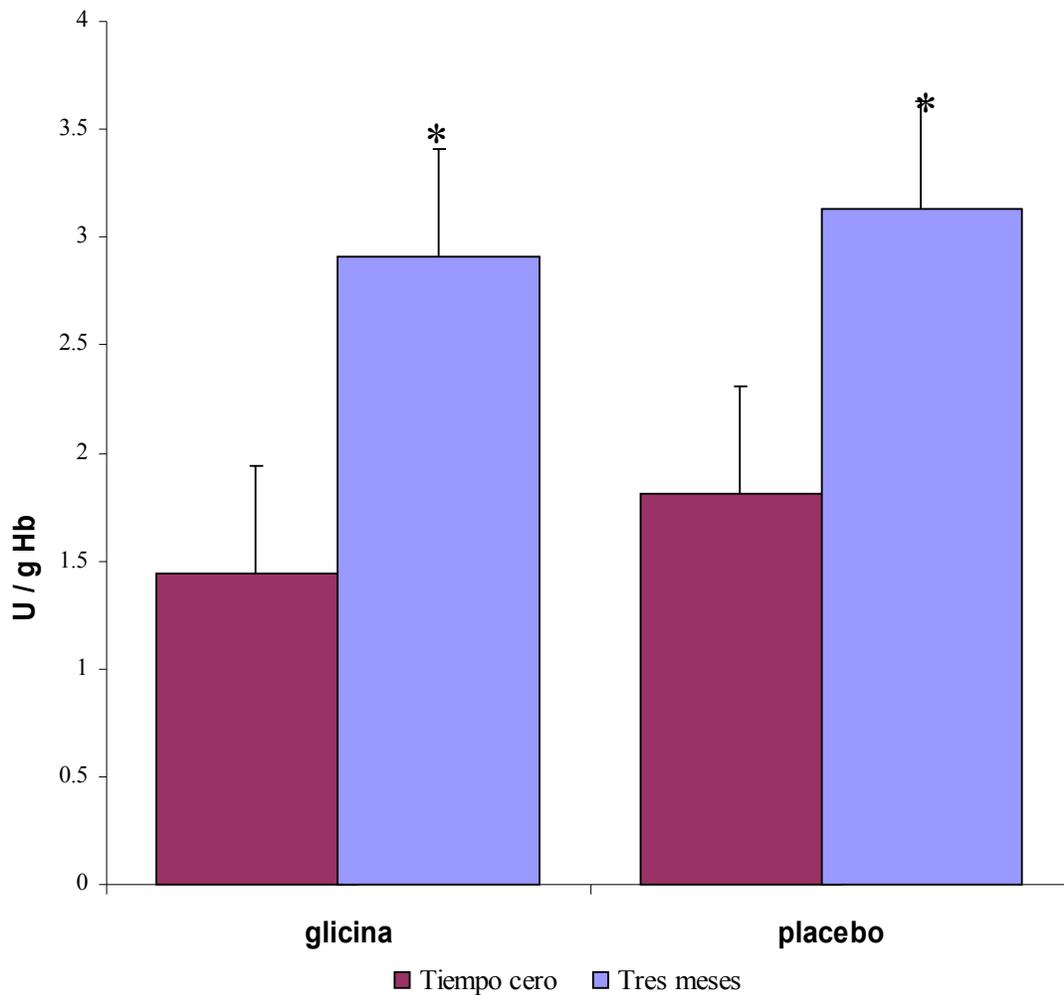
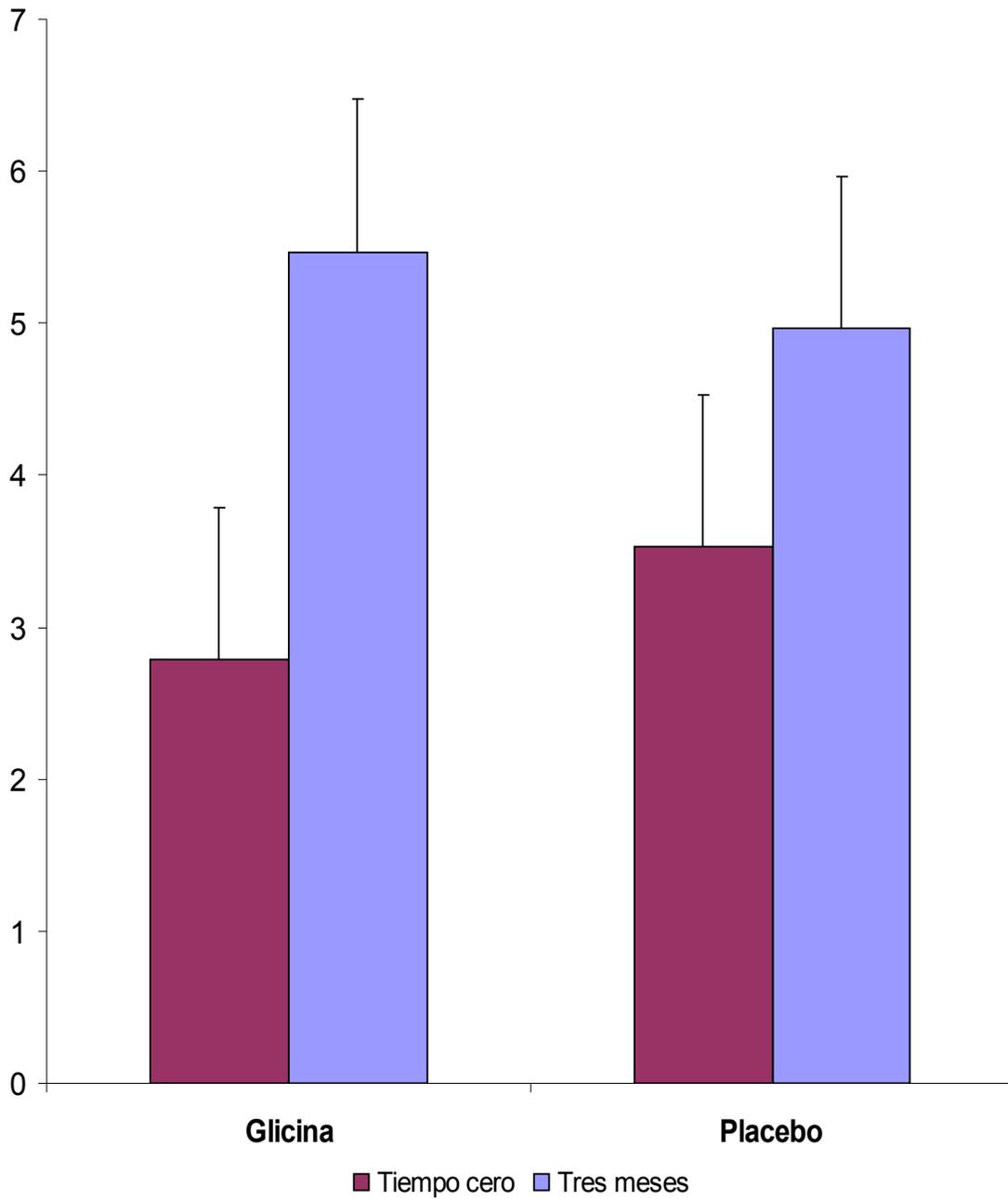


Figura 17. La gráfica representa el contenido de GSH en eritrocitos de pacientes diabéticos tipo 2. Los valores representan la media \pm la desviación estándar comparado con la actividad inicial. (* $p \leq 0.0001$)



5. DISCUSIÓN

Gran parte de los esfuerzos actuales en la investigación de los procesos de glucosilación no enzimática, están dedicados a la búsqueda de procedimientos que permitan revertir o soslayar sus efectos. Una estrategia, que continúa en estudio, consiste en la ingesta de una molécula señuelo que pudiera evitar la interacción de la glucosa con la proteína, es decir una molécula que compita con la proteína. La molécula promisorio pudiera ser la *glicina*; ya que en ensayos pilotos clínicos y experimentales disminuye HbA1c, además de contar con propiedades anti-inflamatorias. Por ello la importancia de conocer más de cerca los mecanismos moleculares a través de los cuales la *glicina* realiza sus acciones; además de estudiar diversos sistemas y parámetros con este fin.

De los resultados derivados del estudio fue evidente que los tratamientos de *glicina* y *placebo* disminuyeron HbA1c asociada con aumentos significativos en el contenido de GSH y la actividad de G6PDH; GAPDH no mostró cambios significativos. Además, valores similares de los GSH, G6PDH y GAPDH fueron observados al finalizar los tratamientos.

Al inicio del estudio un valor bajo de GSH (comparado con el referido en la literatura científica) fue detectado en los participantes, así como un porcentaje alto de HbA1c. Por otro lado el incremento de GSH al final de los tratamientos ocasionó una reducción significativa de HbA1c. Estos cambios muestran una asociación inversa entre GSH y HbA1c vinculada con la actividad de G6PDH en los eritrocitos. Existen evidencias que en células deficientes de GSH y G6PDH aumenta el riesgo de glicación de proteínas, lo cual conlleva a un mayor daño celular.⁷⁹

En las células rojas sanguíneas el antioxidante no enzimático más predominante es el GSH, considerado por ser un sistema de desintoxicación móvil de la circulación, además de evitar la oxidación de las proteínas. En esta apreciación, en diabetes tipo 1 y 2 las concentraciones de GSH en el eritrocito están disminuidas, al igual que la actividad de glutatión reductasa. La función de glutatión reductasa es mantener el ciclo redox del GSH, a través de catalizar la protonación del disulfuro del glutatión (GSSG) durante la oxidación de NADPH. Mientras otras células cuentan con múltiples vías de producción de NADPH, en el eritrocito la única vía para generar NADPH es a través de la vía de las pentosas fosfato. La concentración de glucosa 6 fosfato, intermediario de inicio de la vía no está alterada en

diabetes tipo 2. Sin embargo, G6PDH transforma a la glucosa 6-fosfato en 6-fosfogluconolactona, simultáneo al cambio de NADP^+ a NADPH en el proceso, tiene menor actividad en el eritrocito del paciente diabético con respecto a los sujetos sanos. Lo cual es consistente con el decremento de NADPH indispensable para mantener al GSH. Por otra parte, la glicación de γ -glutamil cisteinil sintetasa, enzima que regula la síntesis del GSH también favorece el decremento del péptido en la diabetes. Considerando lo antes mencionado y en sustento a nuestros resultados al parecer la glicación de la hemoglobina está relacionada con las concentraciones de GSH.

Si bien no encontramos diferencias en el tratamiento de *glicina* con respecto al *placebo*, es cuestionable precisar que factores influyeron para estimular la actividad de G6PDH y a su vez el contenido de GSH. Dado que ningún parámetro bioquímico, excepto HbA1c mostró mejoría. Al parecer los cambios relevantes del estudio están sujetos a la calidad de los nutrientes de la dieta durante el tiempo que requirió el estudio. Con este argumento y el conocimiento que la actividad de G6PDH es regulada por una interacción compleja entre dieta y hormonas. Por lo tanto podemos atribuir que la composición de los nutrientes de la dieta durante el estudio fue un regulador clave de la actividad de G6PDH.

La regulación de la actividad de G6PDH por el estado nutricional involucra señales intracelulares generadas por hormonas, tales como la insulina y metabolitos de nutrientes de la dieta, monosacáridos y ácidos grasos poli-insaturados. No obstante que no se reconocen alteraciones covalentes o alostéricas en respuesta a modificaciones nutricionales; sí se ha observado fosforilación de G6PDH coincidiendo con un decremento en la actividad celular de endotelios cultivados con alta concentración de glucosa, así como en riñón de rata diabética inducida con estreptozotocina. Los efectos de los nutrientes sobre la actividad de G6PDH originan cambios en la cantidad de la proteína, velocidad de síntesis y degradación; involucrando pasos exclusivamente pos-transcripcionales.⁸⁰

Una asociación positiva se ha encontrado entre hiperglucemia y consumo alto de grasas totales, así como con las saturadas, de origen animal, y el consumo de carne. El aumento del consumo de grasa vegetal y la grasa poli-insaturada al parecer benefician la glicemia⁸¹ Se ha propuesto que el efecto de la grasa de la dieta repercute en la glicemia, a través de la obesidad y a su vez relacionada con resistencia a la insulina. En este contexto el mecanismo propuesto gira en la composición de los fosfolípidos (fosfatidilcolina) de membrana celular de músculo esquelético, que influye en la sensibilidad de la insulina en el

hombre.⁸¹ Asimismo la alteración en la relación repercute en los niveles de HbA1c. Por lo antes mencionado, cabe la posibilidad que parte de los decrementos de HbA1c también se deban a la composición de la dieta de los participantes, además del incremento de GSH vía G6PDH.

La glicación de la hemoglobina es un proceso complejo que involucra la condensación del grupo carbonilo del carbohidrato, con un grupo amino *N*-terminal de las cadenas α y β y ciertos residuos de lisina de la hemoglobina dando origen primero a una base de Schiff, que por rearrreglos moleculares forma los productos tempranos de glicación, también llamados de Amadori o comúnmente referidos con hemoglobina glicada. Los compuestos de Amadori experimentan deshidratación, oxidación y fragmentación para formar a los primeros AGEs. El mecanismo por el cual GSH disminuye la formación de HbA1c se desconoce pero se plantea que durante el primer paso de la reacción temprana de glicación de proteínas; en el cual se obtiene el tautomerismo del azúcar para formar el radical enediol de la glucosa a intermediarios dicarbonilo. Es posible que GSH evite la oxidación de enediol a intermediarios dicarbonilos de la glucosa. Por lo que una deficiencia de GSH puede estimular la glicación de proteínas relacionada con las concentraciones altas de glucosa.

6. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos se determinó que para el caso de la GAPDH no hubo cambios significativos en su actividad enzimática, comparando entre el grupo al que se administró placebo y el que se administró glicina así como tampoco mostro diferencias al inicio y termino del tratamiento pues quizá para ello sería necesario un mayor tiempo de tratamiento.

En cuanto a la respuesta de G6PDH y GSH al tratamiento encuentro que no hay diferencias entre el tratamiento con glicina y el tratamiento con placebo, sin embargo durante el tiempo que duró el tratamiento hubo un estímulo en la actividad de la G6PDH el cual también se ve reflejado en el contenido de GSH, obviamente al incrementarse la actividad G6PG y GSH se está contribuyendo a la mejora de los sistemas antioxidantes, pues el incremento en el contenido de GSH implica la mejora del sistema antioxidante mas importante en eritrocito. Estos cambios revelados durante este estudio, están dados mas por el cambio en el estilo de vida y alimentación que probablemente de los pacientes llevaron acabo por el hecho de estar participando en un protocolo de investigación.

7. BIBLIOGRAFIA

1. *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes care. 1997, 20:1183-1193
2. Albert KJ y cols. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus. Part I. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of WHO consultation*. Diabetic Med. 1998, 15:539-593
3. Mathis D, Vence L, Benoist C. *β -cell death during progression to diabetes*. Nature. 2001, 414:792-798
4. Secretaria de Salud *Encuesta nacional de enfermedades crónicas México*. Secretaria de Salud. 2000; Reporte. 1-60
5. Goodman, Louis Standford. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ªed. Mexico. McGraw Hill- Interamericana. 1996; vol 2:1581-1610.
6. DeFronzo Ra, Ferrannini E, Simonson DC. *Fasting hyperglycemia in non-insulin dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake*. Metabolism. 1989; 38: 87-95.
7. Groop LC y cols. *Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance*. J Clin Invest. 1989; 84: 203-13.
8. Contreras F y cols. *Diabetes and hypertension physiopathology and therapeutics*. J Human Hypertension 2000; 14(1): 26-31
9. DeFronzo RA y cols. *Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes*. Diabetes Rev. 1997; 5: 177-269.
10. Contreras F y cols. *Diabetes e Hipertensión*, Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica 2000; 19(1): 11-16.
11. Saad MF y cols Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Mott DM y Bennett PH.

- Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes.* Lancet. 1989; 1:1356-9.
12. DeFronzo RA. Lilly Lecture 1987. *The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM.* Diabetes. 1988; 37: 667-87.
 13. Turner R. The U.K. *Prospective Diabetes Study. A review.* Diabetes Care. 1998; 21(3):35-38.
 14. Fore W. *Noninsulin-dependent diabetes mellitus. The prevention of complications.* Med Clin North Am. 1995; 79(2):287-298.
 15. American Diabetes Association. *Consensus Statement: Role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macro-vascular disease in diabetes.* Diabetes Care. 1993;16(2):72-78
 16. Cai L, Kang YJ. *Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review.* Cardiovasc Toxicol. 2001; 1(3):181-193.
 17. De Vriese AS y cols. *Endothelial dysfunction in diabetes.* Br J Pharmacol. 2000; 1130(5):963-974.
 18. Morauski CJ y cols. *The renin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes: transgenic and interventional studies.* Am J Pathol. 2003; 162(1):151-160.
 19. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, *The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes.* Diabetes. 2002; 51(9):2826-2832.
 20. Januszewski AS y cols. *The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes.* Diabetes. 2002; 51(9):2826-2832.
 21. Koenig R.J. y cols. *Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus.* N Engl J Med. 1976, 295(8):417-420
 22. Best L, Thornally PJ. *Trioses and related substances: tools for the study of pancreatic beta cell function.* Biochem Pharmacol. 1999; 57(6):583-588.

23. Wells-Knecht KJ, Lyons TJ, McCance DR, Thorpe SR, Feather MS, Baynes JW. *3-deoxyfructose concentrations are increased in human plasma and urine in diabetes*. Diabetes. 1994; 43(9):1152-1156.
24. Yamada H, Miyata S, y cols. *Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. Specific in vivo determination of intermediate and advanced Maillard reaction*. J Biol Chem. 1994; 69(32):20275-20280
25. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. *Chemical modification of proteins by methyglyoxal*. Cell Mol Biol. 1998; 44(7):1139-1145
26. Thornalley P. *Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGES*. Cell Mol Biol. 1998; 44:1013-1023.
27. Brownlee M., Vlassara H., Kooney A., Ulrich P., Cerami A. *Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking*. Science. 1986; 232:1629-1632,
28. Hodgkinson AD, Sondergaard KL, Yang B, Cross DF, Miiward BA, Demaine AG. *Aldose reductase expression is induced by hyperglycemia in diabetic nephropathy*. Kidney Int. 2001; 60(1):211-218.
29. Meister A. *Biochemistry of glutathione*. Greenberg, editors. Metabolism of sulfur compounds. New York: Academic Press; 1975. pp. 101-188.
30. Diplock AT. *Antioxidants and free radical scavengers. Free radical damage and its control*. Amsterdam, Holanda: Elsevier Science BV. 1994; 99:113-130.
31. Trueblood N, Ramasamy R. *Aldose reductase inhibition improves altered glucose metabolism of isolated diabetic rat hearts*. Am J Physiol. 1998; 275 H75-H83
32. Gabbay KH. *Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus*. N Engl J Med. 1975; 521-536
33. Fukase S, Sato S, Morl K, Secchi EF, Kador PF. *Polyol pathway and NADPHdependent reductases in dog leukocytes*. J Diabetes Complications.

1996; 10(6):304-313.

34. [Sato S](#), [Secchi EF](#), [Sakurai S](#), [Ohta N](#). *NADPH-dependent reductases and polyol formation in human leukemia cell lines*. [Chem Biol Interact](#). 2003; 143-144:363-71
35. Morgan PE, Dean RT, Davis MJ. *Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack*. *Eur J Biochem*. 2002; 269:1916-1925.
36. Lee AY, Chung SS. *Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract*. *FASEB J*. 1999; 13(1):23-30.
37. Naruse K, Nakamura J, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Komori T, Kato K, Kasuya Y, Miwa K, Hotta N. *Aldose reductase inhibition prevents glucose-induced apoptosis in cultured bovine retinal microvascular pericytes*. *Exp Eye Res*. 2000; 71(3):309-315.
38. Tilton RG, Chang K, Nyengaard JR. *Inhibition of sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats*. *Diabetes*. 1995; 44(2):234-242.
39. Du XL, Edestein D y cols. *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation*. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 97(22):12222-12227
40. Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L. *Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance*. *J Clin Invest*. 1997;99(9):2173~2182.
41. McClain DA, Crook ED. *Hexosamines and insulin resistance*. *Diabetes*. 1996; 45(8):1003-1009.
42. Baron AD, Zhu JS, Garvey WT, y cols. *Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle*. *J Clin Invest*. 1995; 96:2792-2801.

43. Hebert LF, Danieis MC y cols. *Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance*. J Clin Invest. 1996; 98:930-936.
44. Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudiow JE. *Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death*. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(6):2820-2825.
45. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Kohner EM, y cols. *Protein kinase C beta 2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy*. Diabetes. 2003; 52(6):1519-1527.
46. Wolf BA, Williamson JR, Easom RA, Chang K, Sherman WR, Turk J. *Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels*. J Clin Invest. 1991; 87:31-38.
47. Godbout JP, Pesavento J, Hartman ME, Manson SR, Freund GG. *Methylglyoxal enhances cisplatin-induced cytotoxicity by activating protein kinase C delta*. J Biol Chem. 2002; 277(4):2554-2561.
48. Filippis A, Ciark S, Proietto J. *Increased flux through the hexosamine biosynthesis pathway inhibits glucose transport acutely by activation of protein kinase C*. Biochem J. 1997; 324(3):981-985.
49. Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. *AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta in neonatal mesangial cells*. Am J Physiol Renal Physiol. 2000; 278(4):F676-F683.
50. Lindschau C, Quass P, Halier H, y cols. *Glucose-induced TGF-beta 1 and TGFbeta receptor expression in vascular smooth muscle cells is mediated by protein kinase C alpha*. Hypertension. 2003; 42(3):335-341.
51. Park JY, Takahara N, Gabriele A y cols. *Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation*. Diabetes. 2000;49(7):1239-1248

52. Mohamed AK y cols. *The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications*. *Biofactors* .1999;10(2-3):157-167.
53. Gugliucci A, Menini T. *The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors; a new role for old molecules?* *Life Sci*. 2003; 72(23):2603-2616.
54. Kletzien R, Harris P, Foellmi L. *Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a house keeping enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress*. *FASEB J*. 1994; 8(2):174-81.
55. [Rudack D](#), [Chisholm EM](#), [Holten D](#). *Rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase. Regulation by carbohydrate diet and insulin*. *J Biol Chem*. 1971; 246(5):1249-54.
56. [Yan Q](#), [Briehl M](#) y cols. *The NAD⁺Precursors, Nicotinic Acid and Nicotinamide Upregulate Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase mRNA in Jurkat Cells*. [Biochem Biophys Res Commun](#). 1999;255(1):133-136
57. [Salati LM](#), [Amir-Ahmady B](#). *Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase*. *Annu Rev Nutr*. 2001; 21:121-40. Review.
58. [Puskas F](#), [Gergely P Jr](#), [Banki K](#), [Perl A](#). *Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C*. *FASEB J*. 2000;14(10):1352-61.
59. [McDermott BM](#), [Flatt PR](#), [Strain JJ](#). *Effects of copper deficiency and experimental diabetes on tissue antioxidant enzyme levels in rats*. *Ann Nutr Metab*. 1994; 38(5):263-9.
60. Mathews CK, Van Holde K E (1996). *Procesos oxidativos: ciclo del acido cítrico y y ruta de las pentosas fosfato*. Ed. Bioquímica. 2ª. Edición. Mc Graw Hill. España pp 563-571
61. [Gaskin RS](#), [Estwick D](#), [Peddi R](#). *G6PDH deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus*. [Ethn Dis](#). 2001; 11(4):749-54.

Review.

62. [Bilmen S, Aksu TA, Gümüslü S, Korgun DK, Canatan D.](#) *Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes.* Clin Chim Acta. 2001; 303(1-2):83-86.
63. [Sirover MA.](#) *Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology.* J Cell Biochem. 1997;66(2):133-140. Review.
64. [Berry MD.](#) *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for small-molecule disease-modifying therapies in human neurodegenerative disorders.* J Psychiatry Neurosci. 2004;29(5):337-345. Review.
65. [Beisswenger PJ, Howell SK, Smith K, Szwegold BS.](#) *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes.* Biochim Biophys Acta. 2003; 1637(1):98-106.
66. [Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, Brownlee M.](#) *Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells.* J Clin Invest. 2003;112(7):1049-57.
67. [Gäreskog M, Cederberg J, Eriksson UJ, Wentzel P.](#) *Maternal diabetes in vivo and high glucose concentration in vitro increases apoptosis in rat embryos.* Reprod Toxicol. 2007;23(1):63-74.
68. Helmut Sies. *Glutathione and its role in cellular functions.* Free Radical and Medicine. 1999;27(9):916-921-
69. Pasrore A. *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification.* Clin ChimActa. 2003;333:19-39.
70. Dincer Y, Alademir Z, Illkova H. *Suceptibility of glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect os glycemc control.* Clin Biochem.2002; 35:297-301
71. Powell L, Nally S M, McMaster D. *Restoration of glutathione levels in vascular smooth muscle cells exposed to high glucose conditions.* Free Rad Biol Med.

2001;31(10):1149-1155.

72. <http://es.wikipedia.org/wiki/Glicina>
73. Matilla B, Mauritz L, Culebras J M. *La glicina: un nutriente antioxidante protector celular*. Nutr. Hosp. 2002;XVII(1):2-9
74. Wheeler M.D, Ikejema K, Enomoto M. *Glycine: a new anti- inflammatory immunonutrient*. CMLS Cell Mol. Life Sci. 1999;56: 843-856
75. Carvajal-Sandoval G, Zamudio-Cortes P. *Prevencion de los daños producidos por la diabetes mellitus y la senescencia*. Gac Med Méx. 2007,143(1):51-59
76. Alvarado-Vazquez N, Lascurain R. *Oral glycine administration attenuates complications in streptozotocin-induced diabetic rats*. [Life Sci](#). 2006, 13;79(3):225-232.
77. Willians J. "*Willians Hematology*". Ed.In chief Willians. New York. McGraw- Hill . 6a. Ed. 1996 pp. 116
78. http://es.wikibooks.org/Enzimopat%C3%ADas_Eritrocitocitarias
79. Sushil K. Jain. [Glutathione and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Can Increase Protein Glycosylation](#) Free Radical Biology and Medicine. 1998, 24(1):197-201
80. Salati L M. *Nutritional regulation of mRNA processing*. J Nutr. 2004;134(9):2437S-2443S.
81. Clore N, Harris P. *Changes in phosphatidylcholine fatty acid composition are associated with altered skeletal muscle insulin responsiveness in normal man*. Metabolism 2000. 49:(2):232-38