

11213



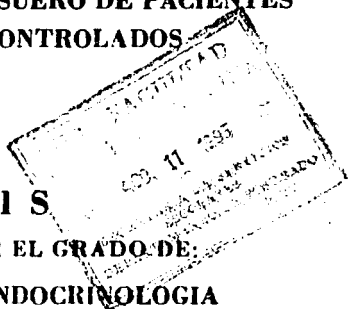
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN



FALLA DE ORIGEN

VITAMINA E: EFECTOS EN GLUCOSILACION DE PROTEINAS Y LIPIDOS EN SUERO DE PACIENTES DIABETICOS DESCONTROLADOS



TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGIA

PRESENTA:

JUAN CARLOS LOPEZ ALVARENGA

[Firma manuscrita]

TUTORES: DR. FRANCISCO J. GOMEZ PÉREZ
DRA. VICTORIA VALLES

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

SUBDIRECCION DE ENSEÑANZA

MEXICO, D. F.

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
ENDOCRINOLOGIA

Coordinador del Curso: Dr. Juan A. Rull Rodrigo

VITAMINA E : EFECTOS EN GLUCOSILACION DE
PROTEINAS Y LIPIDOS EN SUERO DE PACIENTES
DIABETICOS DESCONTROLADOS

Alumno: Juan Carlos López Alvarenga
Tutores: Dr. Francisco J. Gómez Pérez
Dra. Victoria Valles

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
A. ANTECEDENTES	5
A.1. GENERALIDADES	5
A.2. CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS PROTEINAS.	6
A.3. MÉTODOS PARA EVITAR LA GLUCOSILACIÓN DE PROTEINAS.	9
B. JUSTIFICACION	10
HIPOTESIS	11
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y METODOS	11
A. ESTRUCTURA DEL ESTUDIO	11
B. ELEGIBILIDAD	12
B.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	12
B.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	13
B.3. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	13
C. MÉTODOS ESTADÍSTICOS Y NÚMERO DE PACIENTES	14
D. MÉTODOS ESTADÍSTICOS	14
E. MEDICIONES DE LABORATORIO	14
ASPECTOS ETICOS	16
RESULTADOS	16
A. ANALISIS DE DISTRIBUCION DE LAS VARIABLES.	17
B. ANÁLISIS DE SECUENCIAS.	18
C. ESTADO BASAL	18
D. FRUCTOSAMINA	20
E. GLUCEMIA Y HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (HbA_{1c}).	20
F. APO A Y APO B.	20
G. ANALISIS POR CUARTILES.	21
H. ADHERENCIA AL MEDICAMENTO Y REACCIONES SECUNDARIAS.	21

DISCUSION**22**

BIBLIOGRAFIA**26**

RESUMEN

INTRODUCCION. Múltiples estudios clínicos han mostrado evidencia histológica y bioquímica de que las complicaciones de la diabetes se relacionan con la hiperglucemia. Se ha sugerido que la administración de vitamina E parece disminuir la glucosilación de proteínas en pacientes diabéticos, independiente de los cambios en glucemia, probablemente debido a la inhibición de la glucosilación lábil, el primer paso de la reacción de Maillard.

OBJETIVO. Examinamos los efectos de 1200 mg/day p.o. de vitamina E en pacientes con diabetes mellitus descontrolada, en un estudio doble ciego, cruzado, controlado con placebo.

MATERIAL Y METODOS. Incluimos 60 pacientes con diabetes descontrolada, de ambos sexos con edades entre 18 y 70 años. No intentamos mejorar la glucemia, excepto en caso de presentarse un episodio de descontrol agudo. El grupo I tuvo un periodo de dos meses en el que recibieron 1200 mg de vitamina E, seguido de un periodo de lavado de cuatro semanas. Finalmente un segundo periodo de 2 meses de placebo. El grupo II tuvo una secuencia inversa.

ANALISIS ESTADISTICO. Se utilizó prueba de t pareada para variables con distribución gaussiana y Wilcoxon pareada para variables con distribución no paramétrica

RESULTADOS. Siete pacientes fueron excluidos del estudio, por lo que el análisis se efectuó con 53. La glucemia basal fue de 230.9 ± 9.6 (IC 95% 212.16-249.64) mg/dL y para el grupo de placebo 228.6 ± 12.7 (IC 95% 202.11-255.09) mg/dL con $P=0.88$. La HbA_{1c} basal fue 11.9 ± 0.4 % en ambos grupos. Este hallazgo confirmó el descontrol. La fructosamina basal 468.5 ± 15.9 (IC 95% 437.23-499.77) $\mu\text{mol/L}$ para el grupo de vitamina E y de 466.8 ± 16.5 (IC 95% 430.63-502.97) $\mu\text{mol/L}$ para el grupo de placebo. Luego de ocho semanas de tratamiento, el valor de fructosamina para el grupo de vitamina E fue 463.7 ± 16.3 (IC 95% 431.67-495.73) $\mu\text{mol/L}$ y del grupo de placebo fue 438.4 ± 17.3 (IC 95% 404.87-477.23) $\mu\text{mol/L}$. No hubo diferencia significativa entre los grupos ($P=0.29$).

DISCUSION. No encontramos diferencias significativas luego de ocho semanas de tratamiento con vitamina E al evaluar la glucemia, Hb A_{1c}, fructosamina, colesterol total, triglicéridos, C-LDL, C-HDL, apo A y apo B. En nuestro estudio no pudimos confirmar los hallazgos previos de otros investigadores que encontraron reducción de los niveles de hemoglobina glucosilada con vitamina E.

INTRODUCCION

a. Antecedentes

a.1. Generalidades

En los últimos años, datos de múltiples investigaciones clínicas, histológicas y bioquímicas han ligado fisiopatológicamente las complicaciones crónicas de la diabetes y la presencia de hiperglucemia. Los resultados del estudio de Control de Diabetes y Complicaciones Crónicas, DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) han dado la evidencia final de esta asociación¹. Una vez que las complicaciones están presentes, la mejoría del descontrol glucémico no es suficiente para evitar la progresión del proceso patológico².

En la búsqueda de medidas que eviten o aminoren las complicaciones crónicas de la diabetes, se han efectuado múltiples estudios para señalar los mecanismos por los que la hiperglucemia produce daño tisular. Las características patológicas en diversos órganos muestran generalmente los mismos hallazgos: depósitos de proteínas plasmáticas que contienen carbohidratos y que reaccionan con el ácido perióxico de Schiff. Se han identificado en las glucoproteínas de la membrana basal glomerular y los proteoglicanos que la rodean, además se han caracterizado por alteraciones bioquímicas en la mielina, trastornos en la producción de prostanoideos plaquetarios y anomalías en la secreción de somatomedinas y factores del crecimiento³. Se ha propuesto que un flujo aumentado de hexosas a través de diversas vías metabólicas altera el equilibrio de los metabolitos y productos de síntesis intracelulares, afectando finalmente su función.

De los mecanismos estudiados recientemente, sobresalen la vía de los polioles con sus efectos en el cristalino y nervios, órganos que no requieren insulina para el transporte de glucosa, produciendo cataratas y neuropatía. Otro mecanismo importante es la **glucosilación** excesiva de proteínas. Este es un proceso de unión no enzimática de la glucosa con algunos aminoácidos de las proteínas. Estos productos se acumulan dentro de las células dependientes de insulina, en proteínas circulantes, proteínas que conforman la membrana basal y proteínas estructurales.

a.2. Cambios en la estructura molecular de las proteínas.

La glucosilación de proteínas fue estudiada por Maillard entre 1912 y 1917, la importancia de estos trabajos radicó en la dificultad de esa época para evitar la descomposición de los alimentos. En la II guerra mundial estos trabajos tuvieron auge por los problemas que surgieron de la necesidad de preparar comidas deshidratadas y concentradas que pudieran ser almacenadas en climas tropicales sin descomposición⁴.

En 1972 Dixon caracterizó la reacción de glucosa con valilhistidina en una solución acuosa de acetato de piridina y encontró que el producto obtenido fue idéntico al que Holmquist y Schroeder encontraron en la Hb A_{1c}. Esto sugirió que los niveles de esta variante de Hb podría ser el resultado de glucosilación no enzimática de Hb A a las concentraciones de glucosa normalmente encontradas en el glóbulo rojo. El aumento de los niveles de Hb A_{1c} en los pacientes diabéticos apoyó esta propuesta⁵.

Actualmente está reconocido que la capacidad de reaccionar de los azúcares con los aminoácidos de las proteínas ocurre a través de reacciones no enzimáticas. Con hidroxilamina el orden de reactividad es ribosa > arabinosa > manosa > galactosa >

glucosa. Se ha documentado una alta reactividad con glucosa-6-fosfato y hemoglobina, lo que ha sido atribuido a la afinidad por la unión al difosfoglicerato. Sin embargo, por lo difícil que es efectuar este tipo de mediciones aun permanece oscuro su significado⁵.

La glucosilación no enzimática ocurre *in vivo*, y se ha visto que es entre un glúcido reductor y el grupo epsilon (ϵ) amino de los residuos de lisina, el grupo α -amino del N terminal de la cadena polipeptídica o los grupos amino de las bases de ácidos nucleicos⁶.

Una vez que se ha unido un grupo amino a un azúcar, ocurre cierto número de transformaciones que pueden resumirse^{6,4} como sigue:

1. La reacción entre el grupo aldehído del monosacárido y el grupo amino produce una aldimina inestable (base de Schiff), su velocidad de formación es igual a las de su disociación, por lo que su concentración aumenta en función de la concentración de glucosa.
2. La base de Schiff formada sufre un rearrreglo intramolecular lento, con subsecuente deshidratación y ciclización o condensación de la amina, que la transforma en un compuesto más estable (cetoamina, fructosamina o compuesto de Amadori). Esta transformación es una reacción reversible pero en unas cuatro semanas alcanza el equilibrio desplazándose hacia la formación del compuesto de Amadori. Este compuesto puede experimentar numerosos reacomodos. El aumento de la concentración de glucosa determina un aumento proporcional en la acumulación del compuesto de Amadori por una simple acción de masas.
3. Transformación en productos de glucosilación avanzada por una degradación oxidativa a ácido eritronico y a carboximetilisina que se unen a proteínas. La identificación de estos compuestos en orina, sugiere que dicha degradación ocurre *in*

vivo. La variabilidad genética puede explicar la susceptibilidad al daño tisular. Otra forma de producto de glucosilación avanzada es el resultado de la combinación de una molécula de compuesto de Amadori y uno de sus derivados, la 3-deoxiglucosona.

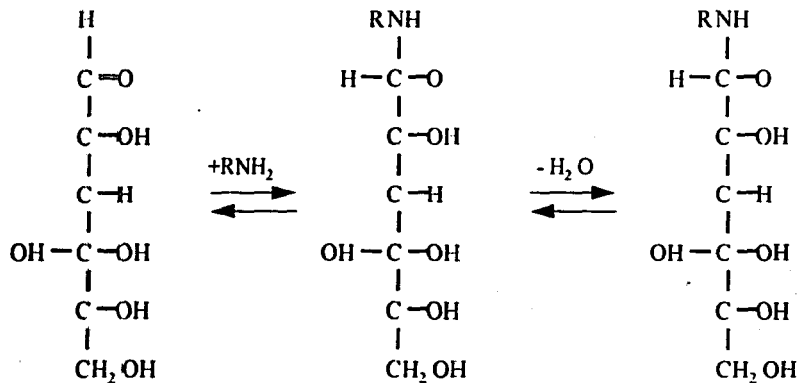
Los principales factores determinantes para la glucosilación son: la concentración de glucosa en suero y el tiempo de exposición, así a mayor glucemia y tiempo de exposición la velocidad y el estado estable de los productos de glucosilación avanzada aumentan, a través de la ley de acción de masas.

El mejor ejemplo de glucosilación no enzimática es la hemoglobina glucosilada. En este proceso, la glucosa se une rápidamente a los grupos amino de las proteínas, específicamente con valina, a través de un proceso de adición nucleofílica para formar productos de Schiff; en horas, estos productos alcanzan el nivel de equilibrio, que es proporcional a la concentración de glucosa sanguínea. Subsecuentemente sufren rearrreglo de Amadori para formar productos de glucosilación temprana más estables, que alcanzan niveles de equilibrio en semanas⁷.

La formación excesiva de productos de glucosilación temprana pueden afectar adversamente una variedad de funciones relevantes incluyendo la captación de lipoproteínas de baja densidad por su receptor⁸ y la alteración en una amplia diversidad de proteínas circulantes⁹. Estudios previos en cultivos de fibroblastos humanos han mostrado que la glucosilación no enzimática de lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuye la afinidad por el receptor que media la salida de colesterol, por tanto la convierte en funcionalmente anormal y probablemente *in vivo* contribuye al desarrollo acelerado de aterosclerosis en los pacientes¹⁰.

La glucosilación no enzimática de lipoproteínas de baja densidad (LDL) con la autooxidación de la glucosa pueden regular el daño vascular producido por radicales libres¹¹ que contribuyen a la formación de puentes cruzados dando alteraciones en la

Figura 1. Reacción de Maillard (Basado en: Lee TC, Diabetes 1982;31:37-46)



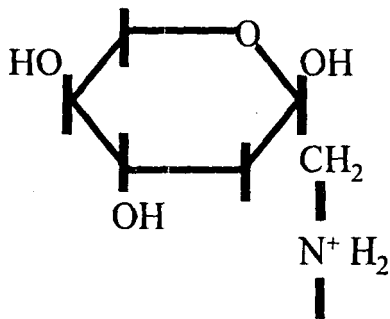
Glucosa en forma de aldehído

Adici3n del grupo amino
(Base de Schiff)

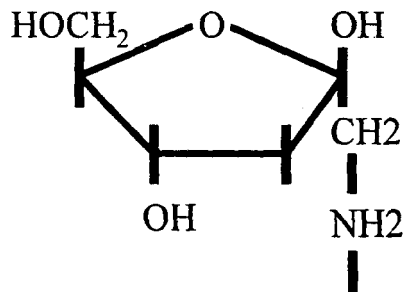
Glicosilamina N-sustituída
(Compuesto de Amadori)

Figura 2. Estructuras hipotéticas de hemiacetal
cíclico por reordenamiento de Amadori

(Basado en: Means, Diabetes 1982; 31:1-4)



β - Piranosa



β - Furanosa

degradación de dichas lipoproteínas. Algunos estudios han demostrado *in vitro* que las alteraciones producidas por la glucosilación de LDL incluyen modificaciones en la migración electroforética y disminución en la afinidad con el receptor, lo que puede contribuir al desarrollo de aterosclerosis acelerada¹².

a.3. Métodos para evitar la glucosilación de proteínas.

El clorhidrato de aminoguanidina ha sido uno de los agentes empleados para prevenir la formación de productos de glucosilación avanzada, bloquea los grupos carbonilo reactivos de los compuestos de Amadori y de sus derivados (3-deoxiglucosona, glucoaldehído). La aminoguanidina tiene baja toxicidad y no interfiere con la formación normal de la estructura terciaria de enzimas³.

La vitamina E (α -tocoferol) tiene un efecto antioxidante, por lo que protege contra varios medicamentos, metales y sustancias químicas que pueden iniciar formación de radicales libres. Se absorbe en el tracto gastrointestinal en forma parecida a las otras vitaminas liposolubles, por lo que la bilis es necesaria¹³.

Algunos autores han evaluado la posibilidad de inhibir la glucosilación *in vivo* con el uso de vitamina E¹⁴. Los resultados de este estudio mostraron que la administración de vitamina E puede reducir la glucosilación de proteínas en sujetos diabéticos, en grado dosis dependiente, 400, 600 y 1200 mg, notándose un efecto creciente de disminución de la glucosilación. El efecto fue independiente de los cambios de la glucemia, probablemente debido a la inhibición de la glucosilación labil, que es el primer paso de la reacción de Maillard. Las proteínas glucosiladas fueron medidas con el método del ácido tiobarbitúrico^{15, 16, 17}.

Otros investigadores han reportado que la administración de 900 mg de vitamina E en un periodo de tres meses mejoró el control metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo II (n=25). La administración del medicamento redujo significativamente la glucemia, Hb A_{1c}, triglicéridos, colesterol total, C-LDL, y apo-B¹⁸.

Otro efecto benéfico que se ha atribuido a la vitamina E es en la prevención de macroangiopatía diabética¹⁹ por disminución del TXA₂. También se ha demostrado que restaura la síntesis de PGE₂ y PGI₂ en cultivo de células de aorta luego de ser sometidos a condiciones de hiperglucemia²⁰.

b. Justificación

Se ha demostrado una alta prevalencia de diabetes mellitus no insulino dependiente en México, de tal magnitud que se le ha considerado un problema de salud pública. La Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas realizada en 1993, mostró una prevalencia de 8.6% en el rango de edades entre 20 y 69 años. El descontrol crónico de los pacientes diabéticos es muy frecuente en las consultas generales por lo que las complicaciones adversas son frecuentes. Algunas de ellas tienen diversos niveles de gravedad como neuropatía, nefropatía y retinopatía diabéticas, por lo anterior existe una gran necesidad de identificar medidas terapéuticas capaces de prevenirlas o disminuirlas. Las ventajas que esto tendría no son despreciables desde el punto de vista costo-beneficio económico y social.

HIPOTESIS

La administración de 1200 mg de vitamina E en pacientes con diabetes mellitus descontrolada es capaz de disminuir los niveles de hemoglobina glucosilada y fructosamina circulantes.

OBJETIVOS

1. Determinar si la vitamina E puede disminuir la cantidad de hemoglobina glucosilada y fructosamina.
2. Determinar si la vitamina E puede modificar las concentraciones de lípidos, lipoproteínas y apoproteínas.

MATERIAL Y METODOS

a. Estructura del estudio

Este es un estudio de **cohortes prospectivo, longitudinal**. Los pacientes recibieron una maniobra aleatoriamente asignada, por lo que es **experimental**.

Los pacientes fueron divididos en dos grupos y en forma aleatoria ciega se les asignó la secuencia del tratamiento por bloques.

El laboratorio farmacéutico se encargó de hacer formas de medicamento activo y placebo de igual forma, sabor y consistencia. El activo consistió en vitamina E, capsulas de 400 mg y el placebo en materia gelatinosa inerte. También el laboratorio mantuvo ciegos los códigos de los frascos del medicamento.

Una vez que los pacientes entraron al estudio, se formó el grupo I al que se asignó aleatoriamente vitamina E 400 mg tres veces al día y el grupo II tomó placebo tres veces al día. El primer período duró 8 semanas y luego hubo un período de lavado con placebo que duró 4 semanas. Luego los medicamentos se intercambiaron: el grupo I recibió placebo y el grupo II el activo, durante ocho semanas más (segundo período).

Los pacientes fueron entrevistados por médicos cada dos semanas, en las que se registraron signos vitales, peso y se hicieron exámenes de laboratorio. Se tomaron muestras de sangre y se separó el suero, los exámenes fueron glucemia, fructosamina, albúmina, glucosuria, APO-A₁, APO-B₁₀₀, triglicéridos, colesterol, C-HDL, C-LDL.

Durante el período basal y al final de las ocho semanas de cada brazo del tratamiento se les midió HbA_{1c}, Na, K, TGO, TGP, biometría hemática y bilirrubina total.

Los tratamientos concurrentes de los pacientes se respetaron sin hacerlos modificaciones, excepto que tuviesen glucemias mayores de 400 mg/dl o que en caso de ser pacientes con DMID presentaran además cuerpos cetónicos en la orina.

b. Elegibilidad

b.1. Criterios de inclusión

1. Pacientes con diabetes mellitus de la consulta externa de diabetes del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".
2. Diabetes mellitus tipo I y tipo II.

3. Glucemias entre 180 y 250 mg/dL.
4. Hb A_{1c} mayor de 7 %.
5. Sin enfermedad sistémica grave o incapacitante.
6. Hemoglobina mayor de 12 gr/dL.
7. Consentimiento escrito del paciente para entrar en el protocolo.

b.2. Criterios de exclusión

1. Pacientes con control adecuado: glucemias menores de 180 mg/dl o hemoglobina glucosilada menor de 7%.
2. Enfermedad sistémica descompensada o grave.
3. Embarazo comprobado.
4. Anemia (Hb menor de 12 gr/dL) demostrada.
5. Que el paciente no desee participar en el protocolo.

b.3. Criterios de eliminación

1. Pacientes que presenten descontrol agudo: estado hiperosmolar o cetoacidosis.
2. Glucemias mayores de 400 mg
3. Cuerpos cetónicos en la orina o muestras clínicas de cetoacidosis.
4. No cumplimiento del 75% de las visitas programadas.
5. Corrección de la glucemia dentro del primer mes de tratamiento, ya que entonces sería imposible el análisis del efecto de la vitamina E.
6. Deseo del paciente de salir del protocolo.

c. Métodos estadísticos y número de pacientes

Se empleó el programa estadístico STATGRAPHICS versión 7.1:

Utilizando un error α de 0.05, un error β de 0.1 y asumiendo una δ en fructosamina de 60 $\mu\text{mol/L}$ y desviación estándar de 130 $\mu\text{mol/L}$, se obtiene una muestra de 50 pacientes. Utilizando los datos de Ceriello¹⁴ de fructosamina en nmol/mg de proteínas con una δ de 0.6 y desviación estándar de 0.2, la cantidad de pacientes es de 12.

Como el estudio es doble ciego, cruzado, la eficiencia estadística que se logra es máxima, ya que equivale a haber utilizado 116 pacientes: 58 con medicamento activo y 58 con placebo. La potencia que esperamos obtener es del 90-95%.

d. Métodos estadísticos

Se efectuará prueba de Wilcoxon para muestras pareadas cuando las variables hayan mostrado distribución no paramétricas y prueba de t de Student pareada y no pareada cuando la distribución sea paramétrica.

e. Mediciones de laboratorio

1. Fructosamina: Se utilizó el método de reducción del azul de nitrotretazolio en medio alcalino²¹, con estuche reactivo de laboratorios Boehringer Mannheim. El coeficiente de variación (CV) interensayo fue de 5.11%. ($\mu\text{mol/L}$)

2. Glucosa: Se utilizó el método descrito por Trinder²² de glucosa oxidasa, GOD-PAP[®], estuche reactivo de laboratorios Boehringer Mannheim. El coeficiente de variación interensayo fue de 3.17%.
3. Colesterol total: Se utilizó el método descrito por Siedel²³, CHOL[®], estuche reactivo de laboratorios Boehringer Mannheim. El coeficiente de variación interensayo fue de 2.89%.
4. Triglicéridos: Se utilizó el método de hidrólisis enzimática de los triglicéridos y determinación enzimática subsecuente del glicerol formado²⁴, GPO-PAP[®], estuche reactivo de laboratorios Boehringer Mannheim. El coeficiente de variación interensayo fue de 4.99%.
5. Para determinar el C-HDL se utilizó el método de precipitación con ácido fosfotúngstico y Mg⁺⁺²⁵, y para C-LDL se utilizó método de precipitación con polivinilsulfato. El colesterol fue determinado con CHOP-PAP[®] high performance en el equipo automatizado HITACHI 705. El coeficiente de variación interensayo para C-HDL fue de 3.7% y para C-LDL fue de 2.33%.
6. Hb A_{1c}: Se utilizó el sistema de electroforesis Paragon Beckman[®] en placas de agarosa al 2%.
7. Para determinar el valor de apo A y apo B se utilizó el método inmunturbidimétrico, Tina-quant[®], estuche reactivo de laboratorios Boehringer Mannheim. (٢٣١٤٤)

Se utilizó el esquema de control de calidad interna para determinaciones de laboratorio que ha sido propuesto por las Organización Mundial de la Salud.

ASPECTOS ETICOS

El estudio fue realizado de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki, los reglamentos del comité de ética intrahospitalario y fue aprobado por el comité de ética médica de estudios en humanos del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Los pacientes firmaron una hoja de consentimiento en la que se asentó la confidencialidad del estudio, así como la completa libertad del paciente de poder retirarse cuando lo considerase necesario sin que esto afectara su posición de usuario del Instituto.

RESULTADOS

Entraron al protocolo 60 pacientes de ambos sexos, edades entre 18 y 70 años, en descontrol crónico. No intentamos mejorar los niveles de glucemia, excepto que el paciente presentara peligro de descontrol agudo, con el objeto de evaluar el efecto de vitamina E.

Se excluyeron dos pacientes durante el primer periodo: Una por urosepsis, fue internada en la Unidad de Urgencias. Otra paciente suspendió por su cuenta la ingesta de las cápsulas durante un mes. El primer periodo finalizó con 58 pacientes.

En el segundo periodo se excluyeron cuatro pacientes: Uno por presentar un cuadro infeccioso. Dos suspendieron la ingesta de cápsulas. Finalmente, otro paciente cambió de domicilio al interior de la república y tuvo dificultades para asistir en forma regular a la toma de muestras.

a. Análisis de distribución de las variables.

En el "Resumen de distribuciones" que se encuentra al final, observamos que las variables con distribución gaussiana, y que se analizaron con t de Student para muestras pareadas y no pareadas. La distribución para apo A y apo B tienen un ligero sesgo a la derecha, sin embargo, la media y medianas de ambas distribuciones son muy similares. Se analizaron como gaussianas (ver hoja de distribuciones):

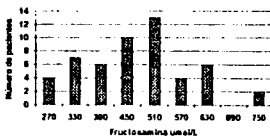
1. Fructosamina
2. Hb A_{1c}
3. Colesterol total
4. Colesterol LDL (Baja densidad)
5. Colesterol HDL (Alta densidad)
6. Apo A (Con ligero sesgo a la derecha)
7. Apo B (Con ligero sesgo a la derecha)

En cuanto a las variables que presentaban mucho sesgo a la derecha o con distribución casi rectangular, se analizaron con Wilcoxon para muestras pareadas y no pareadas:

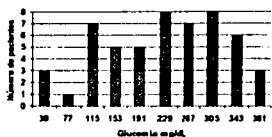
1. Glucemia
2. Triglicéridos

Resumen de distribuciones de las variables

Distribución de frecuencias de fructosamina



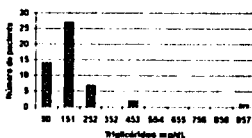
Distribución de frecuencias de glucemias



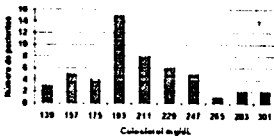
Distribución de frecuencias de Hb A_{1c}



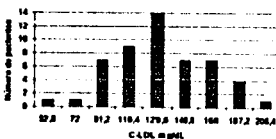
Distribución de frecuencias para triglicéridos



Distribución de frecuencias de colesterol

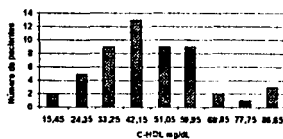


Distribución de frecuencias de C-LDL

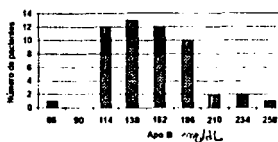


Resumen de distribuciones de las variables

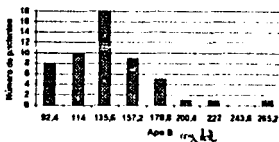
Distribución de frecuencias para C-HDL



Distribución de frecuencias de Apo A

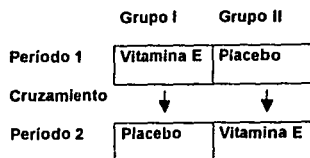


Distribución de frecuencias de Apo B



b. Análisis de secuencias.

Se hizo un análisis de secuencias en tratamiento, tiempo, y diferencias entre placebo y activo de los pacientes²⁰, esquematizándose de la siguiente manera:



La secuencia en el tiempo se demostró comparando el efecto del período uno contra el período dos. No hubo diferencias con significancia estadística.

Se investigó si el orden de la asignación podría haber tenido algún impacto, por lo que se comparó si había alguna diferencia entre la secuencia del grupo I contra la del grupo II. Los valores de p fueron todos mayores de 0.05.

Finalmente, el efecto del tratamiento se investigó comparando como grupo los pacientes con vitamina E contra los mismos pacientes cuando tomaron placebo. Tampoco hubo diferencias.

c. Estado basal.

Las características de los pacientes se observan en la tabla 1.

	MF	Edad	Evolucion (años)	DMND	DMND	HPO	HPO - Insulina	Sul+big	Insulin	IMC
Grupo I	12/16	30.6±18.4	9.6±7.6	20	8	3	9	3	13	23.9±7.0
Grupo II	7/18	43.1±16.5	12.2±6.3	19	6	2	5	3	15	24.0±3.4

Tabla 1. Características de los pacientes. No hubo diferencias significativas, $P > 0.05$ entre ambos grupos. M: masculino, F: femenino, HPO: hipoglucemiantes orales, Sul: sulfonilureas, big: biguanidas, IMC: índice de masa corporal.

Las diferencias entre ambos grupos en edad, tiempo de evolución e índice de masa corporal (IMC) no tuvieron significancia estadística. En cuanto al tratamiento de los pacientes, 28 (53%) recibieron exclusivamente insulina subcutánea, 14 (26%) con combinación de hipoglucemiantes orales e insulina, 6 (11%) con sulfonilureas y biguanidas, y 5 (9%) exclusivamente hipoglucemiantes orales. En la tabla 2 mostramos los valores de laboratorio en el estado basal, la glucosa al inicio fue de 230.9 ± 9.6 (IC 95% 212.16-249.64) mg/dL y para el grupo de placebo fue 228.6 ± 12.7 (IC 95% 202.11-255.09) mg/dL con $P=0.88$. La HbA_{1c} basal fue 11.9 ± 0.4 % en ambos grupos. Este hallazgo confirmó el descontrol. La fructosamina basal fue de 468.5 ± 15.9 (IC 95% 437.23-499.77) para el grupo de vitamina y de 466.8 ± 16.5 (IC 95% 430.63-502.97) para el grupo de placebo.

Brazos del estudio	Semana 0		Semana 2		Semana 4		Semana 8	
	Vitamina	Placebo	Vitamina	Placebo	Vitamina	Placebo	Vitamina	Placebo
Fructosam	468.5 ± 15.9	466.8 ± 16.5	463.8 ± 16.1	462.2 ± 18.5	470.4 ± 16.5	458.4 ± 16.6	463.7 ± 16.3	438.4 ± 17.3
Hemob A	11.9 ± 0.4	11.9 ± 0.4	-	-	-	-	12.1 ± 0.4	11.9 ± 0.4
Glucosa	230.9 ± 9.6	228.6 ± 12.7	204.5 ± 11.2	213.8 ± 12.3	221.9 ± 12.8	237.9 ± 13.5	207.1 ± 12.8	195.2 ± 13.4
Colesterol	204.9 ± 5.2	207.5 ± 5.4	201.3 ± 6.6	193.5 ± 5.5	204.8 ± 6.4	201.9 ± 5.6	201.3 ± 6.4	187.4 ± 6.1
Triglicéridos	178.8 ± 22.0	168.5 ± 19.4	269.0 ± 28.0	209.6 ± 28.6	218.4 ± 34.0	177.6 ± 18.2	186.7 ± 20.1	171.0 ± 17.9
C-LDL	130.1 ± 4.7	130.8 ± 4.6	128.4 ± 5.7	122.6 ± 5.3	132.4 ± 5.8	132.3 ± 4.9	129.1 ± 6.5	120.3 ± 5.5
C-HDL	46.6 ± 2.3	46.7 ± 2.3	44.5 ± 2.2	45.9 ± 2.6	43.47 ± 2.3	44.1 ± 2.4	44.4 ± 2.2	42.1 ± 2.3
Apo-A	152.6 ± 4.6	155.7 ± 5.2	158.4 ± 4.8	157.9 ± 5.0	145.0 ± 5.0	143.3 ± 4.0	154.2 ± 4.4	147.3 ± 4.6
Apo-B	144.4 ± 8.9	137.3 ± 4.8	138.6 ± 6.0	128.9 ± 4.7	141.2 ± 5.6	140.2 ± 5.3	142.0 ± 6.3	132.6 ± 5.9

Tabla 2. Mostramos ambos brazos iniciales del estudio, vitamina y placebo (promedio \pm ES). No hubo diferencia significativa entre ellos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

d. Fructosamina

Luego de ocho semanas de tratamiento el valor de fructosamina para el grupo I (vitamina E) fue de 463.7 ± 16.3 (IC 95% 431.67-495.73) y para el grupo II (placebo) fue 438.4 ± 17.3 (IC 95% 404.87-472.23). No hubo diferencia significativa entre estos grupos ($P=0.29$, ver gráfico I).

e. Glucemia y hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}).

Las glucemias basales (230.9 ± 9.6 mg/dL; IC 95% 212.16-249.64) en el análisis de vitamina E no mostraron diferencias con la octava semana (207.04 ± 12.58 mg/dL, IC 95% 182.56-231.47, ver gráfico II).

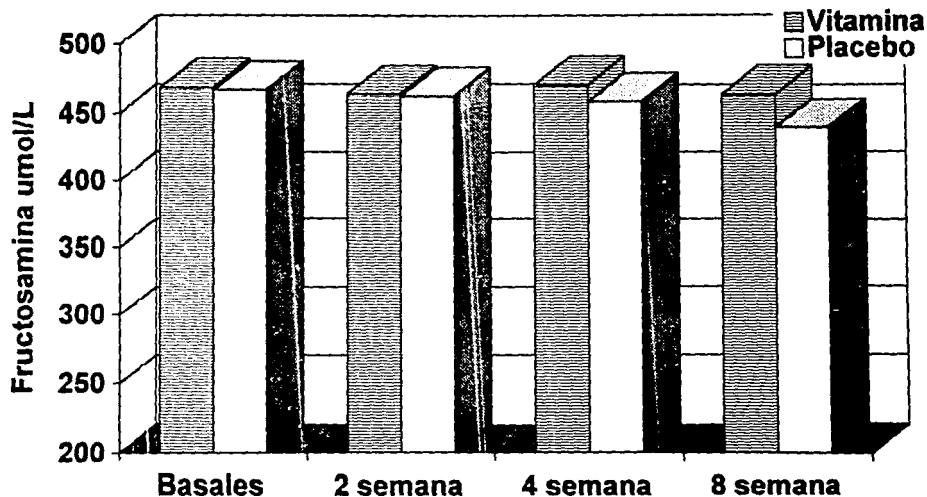
No se demostraron diferencias importantes entre los niveles de HbA_{1c} basales (11.89 ± 0.4) y al final de la octava semana (12.04 ± 0.42 , $p=0.81$) del grupo con vitamina E (ver gráfico III). No hubo diferencias significativas entre los grupos de placebo y activo.

f. Apo A y apo B.

Los niveles basales de Apo A mostraron valores de 154.92 ± 6.76 (IC 95% 145.67-164.17), que no fueron estadística diferentes con los encontrados en la octava semana 150.5 ± 6.26 (IC 95% 142.11-158.89, ver gráfico IV).

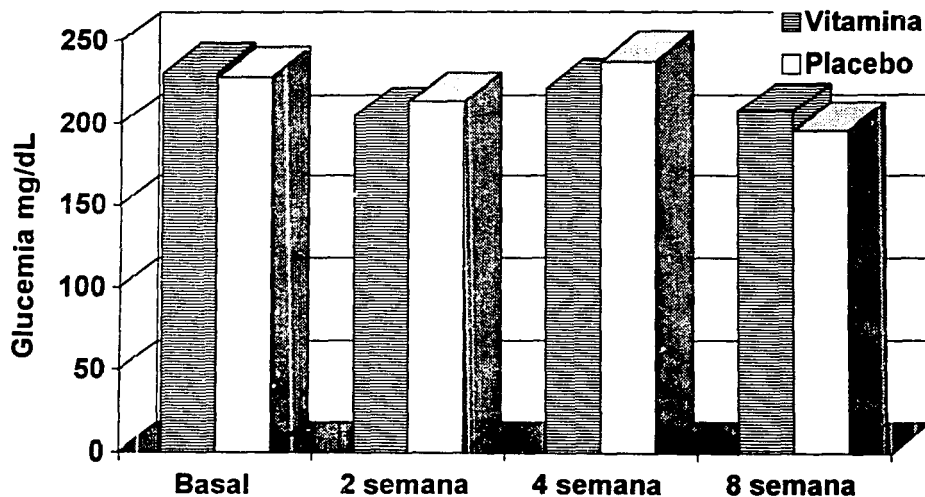
Apo B en el valor basal fue de 123.72 ± 6.15 (IC 95% 106.28-141.16) y al final de la octava semana de 135.9 ± 7.26 (IC 123.7-148.1, ver gráfico V).

Gráfico I. Comparación de los niveles de fructosamina en pacientes que recibieron vitamina E y placebo



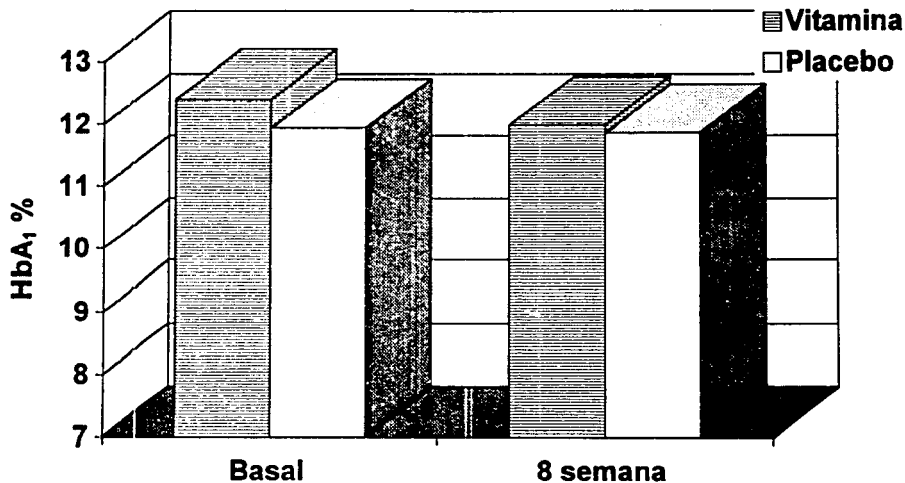
Las diferencias no fueron estadísticamente significativas

Gráfico II. Comparación de glucemias entre la secuencia de vitamina y placebo



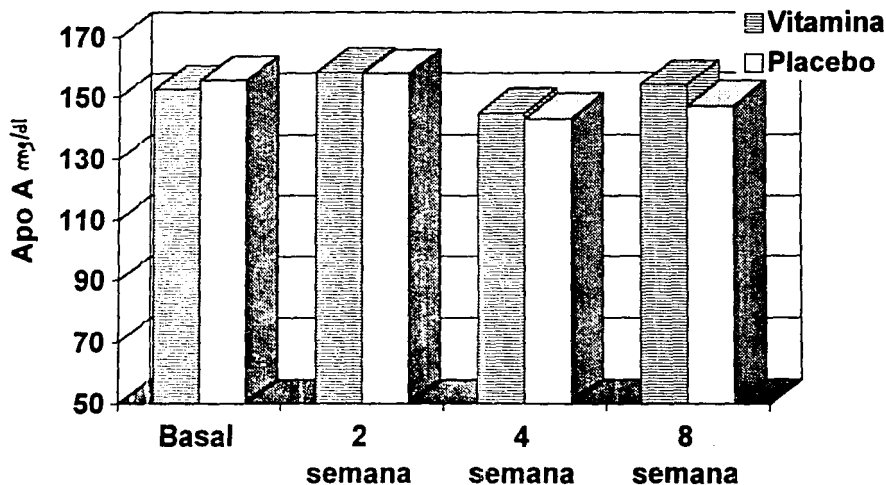
Las diferencias no fueron estadísticamente significativas

Gráfico III. Comparación de HbA_{1c} entre pacientes con vitamina E y placebo



Las diferencias no fueron estadísticamente significativas

Gráfico IV. Comparación de Apo A entre pacientes con vitamina E y placebo



Las diferencias no fueron estadísticamente significativas

g. Analisis por cuartiles.

Para evaluar si pudiera haber diferencias de acuerdo al control metabólico, se realizó una distribución por cuartiles de los niveles de glucemia, Hb A_{1c}, y fructosamina basales.

Encontramos diferencias estadísticamente significativas en el cuartil 4 del análisis grupal de vitamina E. El valor basal de glucosa fue de 328.62 mg/dL (IC 95% 316.79-340.45) que fue disminuyendo rápidamente a 277.69 mg/dL en la segunda semana (IC 95% 235.62-319.76, $p=0.03$), manteniéndose así hasta la octava semana (gráfico V). El grupo de placebo también presentó disminución en el cuarto cuartil a partir de la segunda semana: el valor basal fue 341.96 (IC 95% 329.31-354.61) y el de la segunda semana 292.5 (IC 95% 269.18-315.82, $p<0.01$), manteniéndose en niveles bajos hasta el final del brazo de estudio (gráfico VI).

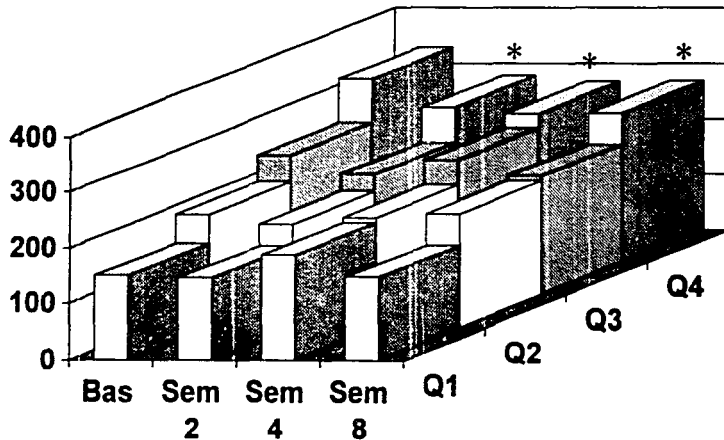
No hubo diferencias significativas al hacer análisis entre cuartiles de fructosamina y Hb A_{1c}.

h. Adherencia al medicamento y reacciones secundarias.

La adherencia al medicamento fue evaluada por conteo de las cápsulas de vitamina E. El 90% (48) de los pacientes cumplió con la entrega de los frascos vacíos, hubo cinco pacientes que en algún momento no entregaron los frascos por pérdida u olvido. Los pacientes que suspendieron el tratamiento *motu proprio* fueron excluidos.

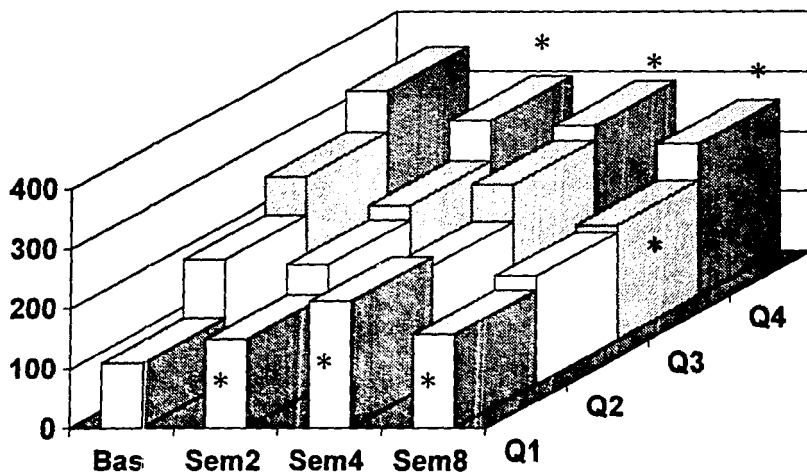
No hubo reacción adversa alguna o alergias contra la vitamina.

Gráfico V. Comparación entre cuartiles de glucemia en pacientes con vitamina E



*p<0.05

Gráfico VI. Comparación de cuartiles de glucemia en pacientes con placebo



* $p < 0.05$

El 70% (37) de los pacientes aseguraron sentir mejoría subjetiva (sensación de bienestar) cuando estuvieron en tratamiento con la vitamina.

DISCUSION

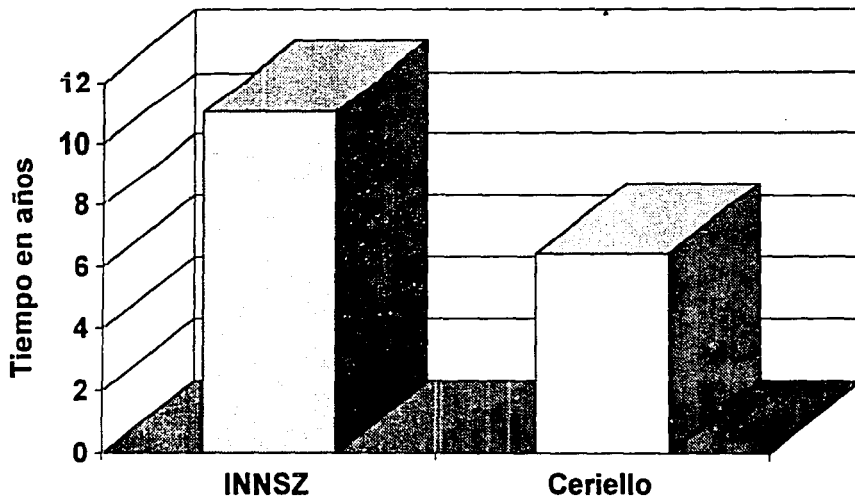
El diseño del estudio, cruzado, doble ciego y experimental, permite una eficiencia estadística mayor, ya que al ser cada paciente su propio control, la variación dentro de cada uno de ellos es menor que si fueran grupos paralelos.

La aleatorización ciega a los investigadores garantiza que no pueden intervenir en el orden de asignación de los tratamientos. El código del laboratorio también ciega a los investigadores en cuanto al tipo de tratamiento que se está dando. Esto permite evitar el error sistemático en el que se incurriría si no estuviera enmascarado.

El número de pacientes da un suficiente valor predictivo para afirmar o negar los hallazgos en los diabéticos descontrolados. Comparando el trabajo del grupo italiano que mostró mejoras en los niveles de glucosilación de proteínas, incluyendo la Hb A_{1c}, en forma independiente del control metabólico de los pacientes. Existieron diferencias importantes en los niveles de hemoglobina glucosilada estable del grupo con vitamina E 1200 mg al día, entre los valores basales ($11.8 \pm 0.7\%$) y al final del estudio ($7.8 \pm 0.5\%$, $p < 0.01$). En nuestro estudio no se demostraron diferencias importantes entre los niveles de Hb A_{1c} basales ($11.89 \pm 0.4\%$) y los finales del grupo con vitamina E ($12.04 \pm 0.42\%$, $p = 0.81$). Esto pudiera ser explicado por la alta concentración de la glucemia de estos últimos pacientes, que por simple ley de acción de masas no es capaz de poder revertir la unión química de los azúcares a las aminas.

Otra diferencia importante entre los dos trabajos, en lo que se refiere al espectro clínico de la población en estudio, fue el tiempo de evolución. En la población italiana,

Gráfico VII. Comparación del tiempo de evolución de diabetes entre el estudio italiano y el del INNSZ



Las diferencias mostraron $p < 0.05$

(gráfico VII) el promedio fue mucho menor que la población en el INNSZ, no sabemos si esto pudiera tener algún significado biológico en cuanto al efecto esperado de la vitamina E.

No encontramos cambios estadísticamente significativos entre los niveles basales y a las ocho semanas después, en las glucemias, hemoglobina glucosilada, fructosamina, colesterol total, triglicéridos, colesterol de LDL, colesterol de HDL, apo A y apo B.

Las modificaciones en los niveles de LDL (apo B) y en los de HDL (apo A) producidos por la glucosilación son, en general, alteraciones con la afinidad por el receptor. En el caso de LDL, tienden a acumularse¹² y con las HDL, existe una disminución en su capacidad de extraer colesterol del interior de las células¹⁰. Por otro lado, la presencia de altos títulos de anticuerpos contra LDL modificadas en pacientes con DMNID está asociado a glucosilación no enzimática de proteínas²⁷. Los productos de glucosilación avanzada y los productos modificados por oxidación tienden a inhibir la relajación vascular dependiente del NO.

Un grupo demostró que con 900 mg de vitamina E pueden disminuir los niveles de triglicéridos, colesterol total, LDL, apo B¹⁸. Otros investigadores recientemente han demostrado que la vitamina E puede aumentar dentro de las subfracciones de LDL, modificando en las poco densas la autooxidación²⁸. Estos mismos autores encontraron que la vitamina E, a dosis de 1600 al día (mayor que la dosis que utilizamos) no modificó la glucosilación de proteínas plasmáticas. Nuestros pacientes tuvieron niveles mucho mayores de glucemia, no sabemos de otras vías bioquímicas que pudieran haber actuado para evitar algún efecto de vitamina E.

Al efectuar el análisis por cuantiles encontramos que a pesar que otros trabajos han mostrado que la vitamina E puede mejorar el control metabólico de los pacientes¹⁸

nosotros reportamos que en nuestros pacientes la mejoría fue en relación con el tiempo y exclusivamente en el cuartil cuatro; esto puede ser debido a la *iatroterapia* sin relación causal con el tratamiento de vitamina E.

Parece que los pacientes con más descontrol glucémico tendieron a la mejoría, lo contrario sucedió con los pacientes que integraron el cuartil uno del placebo, cuya tendencia fue a aumentar los niveles de glucosa. Se confirma lo que los estadísticos han llamado "regresión". Si la vitamina E tuviera algún efecto sobre Hb A_{1c}, que se viera enmascarado por un valor alto de glucemia, hubiéramos observado cambios en el cuartil uno, sin embargo, no los hubo.

Algunos investigadores han mostrado evidencia que el uso de vitamina E previene la enfermedad coronaria. En un estudio prospectivo²⁹ que duró ocho años, en 87 245 enfermeras se comparó el nivel de consumo de nutrientes que contienen vitamina E. Aquellas que por periodos mayores de dos años tomaron suplementos tuvieron un riesgo relativo de 0.59 (IC 95% 0.38-0.91) de padecer de enfermedad coronaria. Los mismos autores³⁰ demostraron que la alta ingesta de vitamina E (más de 60 UI/día) en hombres entre 40 y 75 años les confirió un riesgo relativo de 0.64 (IC 95% 0.49-0.83) de padecer enfermedad coronaria, comparado con aquellos que consumieron menos de 7.5 UI/día. La vitamina C no se asoció a disminución del riesgo.

Aunque la vitamina E ha mostrado utilidad asociada a disminución en el riesgo de enfermedad coronaria, no hemos podido demostrar cambios favorables en lo que se refiere a los niveles de glucemia.

Finalmente, concluimos que el tratamiento con vitamina E no es capaz de disminuir la oxidación de la glucosa para que se una a aminos. Es posible que la hiperglucemia pueda mantener el efecto de acción de masa y una mayor cantidad de compuestos de Amadori, que pudiese llevar al desarrollo de complicaciones

subsecuentes. El control metabólico del paciente sigue siendo la principal meta del tratamiento para evitar las complicaciones crónicas.



BIBLIOGRAFIA

- ¹ The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86.
- ² Solders G, Gunnarson R, Persson A, Wilczek H, Tydon C, Groth C: Effects of combined pancreatic and renal transplantation on diabetic neuropathy. A two years of follow up study. *Lancet* 1987; II: 1232-35.
- ³ Brownlee M. Advanced products of nonenzymatic glycosilation and the pathogenesis of diabetic complications. In Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus: Theory and practice. 4th ed. Edited by Harold Rifkin, Daniel Porte. Elsevier Science Publishers. New York 1990.
- ⁴ Saltmarch M, Labuza T. Nonenzymatic Browning via the Maillard reaction in foods. *Diabetes* 1982; 31 (suppl 3):29-36.
- ⁵ Means GE, Chang MK. Nonenzymatic glycosylation of proteins. *Diabetes* 1982; 31 (suppl 3):1-4.
- ⁶ Gagliardino JJ, Rebolledo OR. Glucosilación no enzimática de proteínas y complicaciones crónicas de la diabetes en: Rull JA, Zorrilla E, Jadzisky MN, Santiago JV, ed. *Diabetes Melitus. Complicaciones crónicas*. México: Nueva Editorial Interamericana. 1992:59-70.
- ⁷ Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43:836-841.
- ⁸ Sasaki J, Cottam GL. Glycosilation of LDL decreases its ability to interact with high affinity receptors of human fibroblasts in vitro and decreases its clearance for rabbit plasma in vivo. *Biochem Biophys Acta* 1982; 713:199-207.
- ⁹ Schleicher ED, Gerbitz K, Dolhoffor R, Reindl E, et al: Clinical utility of non enzymatically glycosylated blood proteins as and index of glucose control. *Diabetes Care* 1984, 7:548-56.
- ¹⁰ Duehl PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosilation of HDL and impaired HDL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes* 1991; 40:377-84.

-
- ¹¹ Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1994; 94: 771-78.
- ¹² Witztum J, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher M, Elam R, Steimberg D. Nonenzymatic glycosylation of low density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* 1982; 31:283-91.
- ¹³ Marcus R, Coulston AM. Fat-soluble vitamins en Goodman A, Nies A. Taylor P, ed. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª edición. McGraw-Hill, 1992; vol II: 1566-69.
- ¹⁴ Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of glycosilation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care* 1991; 14:68-72.
- ¹⁵ Jonson R, Metcalf P, Baker J. Fructosamine: A new approach to the stimulation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chem Acta* 1982; 127:87-95.
- ¹⁶ Kobayashi K, Ogasahara N. Agarose gel electrophoresis with nitroblue tetrazolium coloration for determination of glycaled lipoproteins in serum from diabetics. *Clin Chem* 1990; 36.1: 65-9.
- ¹⁷ Kobayashi K, Ogasahara N, Sakoguchi M. Serum glycaled beta lipoprotein determination by agarose gel electrophoresis with nitroblue tetrazolium. *Clin Chem* 1989; 35.1: 177-78.
- ¹⁸ Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, et al. Daily vitamin E supplements improve metabolic control but no insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care* 1993; 16:1433-37.
- ¹⁹ Gisnger C, Jeremy J, Speiser P, Mikhailidis D, Dandona P, Schernthaner G. Effect of vitamin E supplementation on platelet thromboxane A2 production in type I diabetic patients. *Diabetes* 1988; 37:1260-64.
- ²⁰ Kunisaki M, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H. Vitamin E restores reduced prostacliclin syntesis in aortic endoteial cells cultured with high concentration of glucose. *Metabolism* 1992; 41:613-21.
- ²¹ Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosyl protein. An index of diabetic control. *Clin Chem Acta* 1983; 127:87.
- ²² Trinder P. *Ann Clin Biochem* 1969; 6:24. Referido en Boehringer Mannheim: *Automated analysis for BM/Hitachi Systems 704/705/717*. Boeringer Mannheim GmbH; 1991.

-
- ²³ Siedel JE, Hägele, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Clin Chem 1983; 29:1075. Referido en Boehringer Mannheim: Automated analysis for BM/Hitachi Systems 704/705/717. Boehringer Mannheim GmbH; 1991.
- ²⁴ Wahlefeld AW en HU Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. 3ª edición. Tomo II, pg 1878. Verlag Chemie. Weinheim, 1974.
- ²⁵ Burnstein M et al. Lipid Res 1970; 11:583. Referido en Boehringer Mannheim: Automated analysis for BM/Hitachi Systems 704/705/717. Boehringer Mannheim GmbH; 1991.
- ²⁶ Woods JR, Williams JG, Tavel M. The two-period crossover design in medical research. Ann Intern Med 1989; 110:560-66.
- ²⁷ Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta FG, Bollati P, Finardi G. Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoproteins in NIDDM. Diabetes 1995; 44: 60-66.
- ²⁸ Reaven PD, Herold DA, Barnett J, Edelman S. Effects of vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and low-density lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation in NIDDM. Diabetes Care 1995; 18: 807-15.
- ²⁹ Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JAE, Colditz GA, Rosner B, Willett W. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. N Engl J Med 1993; 328: 1444-9.
- ³⁰ Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N Engl J Med 1993; 328: 1450-6.