



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL DESBALANCE  
REDOX EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctora en Ciencias**

**PRESENTA:  
M. en C. ANGÉLICA SARAÍ JIMÉNEZ OSORIO**

**TUTOR PRINCIPAL  
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
Facultad de Química**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO  
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS  
Facultad de Química**

**MÉXICO, D. F. Marzo 2015.**



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 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.

PMDCB/1132/2014...A

M. en C. ANGÉLICA SARAÍ JIMÉNEZ OSORIO  
Alumno (a) del Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
P r e s e n t e

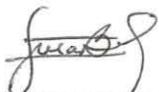
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 24 de noviembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**, con la réplica de la tesis "Estudio de los factores que contribuyen al desbalance redox en pacientes con diabetes mellitus tipo 2", dirigida por el Dr. José Pedraza Chaverri.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
VOCAL	Dra. Verónica Guarner Lans
VOCAL	Dra. Ana María Salazar Martínez
VOCAL	Dra. María Cristina Fernández Mejía
SECRETARIO	Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de noviembre de 2014  
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO



DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

C.c.p. Archivo

BGP\*lgg

## AGRADECIMIENTOS

Al posgrado de Maestría y Doctorado de Ciencias Bioquímicas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Este proyecto fue llevado a cabo gracias al financiamiento otorgado por Fondos Sectoriales Salud CONACYT 2013-201519.



De igual manera, agradezco a CONACYT por su apoyo otorgado para la realización de mi doctorado con número de becario 229357.

## DEDICATORIAS

*A mis padres y familia, por enseñarme día a día a tener fe ante cualquier circunstancia.*

*Dedico con un profundo agradecimiento esta etapa de mi vida a las siguientes personas:*

- *Dr. José Pedraza Chaverri y M. en C. Omar Noel Medina Campos, por su asesoría en todos los aspectos del proyecto*
- *A todos los asesores y participantes del proyecto: Dra. Martha E. Rodríguez Arellano, Dra. Nonanzitl Pérez, Dra. Ortensia Moreno Macías, Dra. Adriana Monroy Guzmán, Dr. Samuel Canizales Quintero y Dr. Armando Tovar Palacios.*
- *A todas las clínicas y el personal involucrado en el reclutamiento de pacientes.*
- *A mis grandes amigas de toda esta etapa: Dra. Susana González y M. en C. Alejandra Picazo Sansón*
- *A mis alumnos de tesis y servicio social, quienes fueron mis manos en este proyecto: Q.F.B. Alejandra Álvarez, Q.F.B. Sebastián Guerra, Dr. Julio Cruz y Dra. Fedra Ponce.*
- *A la M. en C. Claudette Musalem y Lic. Wendy Rodríguez*

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. Diabetes mellitus	2
2.1.1. Prevalencia	2
2.1.2. Diagnóstico	2
2.1.3. Tipos de diabetes	3
2.2. Prediabetes	5
2.3. Diabetes tipo 2	6
2.3.1. Fisiopatología de la diabetes tipo 2	6
2.3.2. Complicaciones de la diabetes tipo 2	8
2.4. Estrés oxidante en la diabetes mellitus	9
2.4.1. Mecanismos generales de estrés oxidante en el desarrollo de diabetes	10
2.4.2. Estrés oxidante y desarrollo de complicaciones secundarias de la diabetes	15
2.5. Factor de transcripción Nrf2 y diabetes	16
2.5.1. Activación de Nrf2	16
2.5.2. Participación de Nrf2 en la resistencia a la insulina	18
2.5.3. Participación de Nrf2 en la disfunción de las células $\beta$	19
2.5.4. Nrf2 y complicaciones de la diabetes	19

2.6. Estudio de polimorfismos de un sólo nucleótido	20
2.6.1. Polimorfismo C242T (rs4673) de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa	21
2.6.2. Polimorfismo Val16Ala (rs4880) de enzima superóxido dismutasa	22
2.7. Integración	22
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos particulares	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Diseño del estudio	26
6.2. Tamaño de la muestra	27
6.3. Obtención de las muestras sanguíneas	28
6.4. Determinaciones clínicas	28
6.5. Marcadores del estado redox	29
6.6. Determinación de Nrf2	34
6.6.1. Extracción de células mononucleares y fracciones nucleares	34
6.6.2. Ensayo de la actividad transcripcional de Nrf2	34
6.7. Extracción del DNA y genotipificación	35
6.8. Análisis estadístico.	35
VII. RESULTADOS	37
7. 1. Características de la población de estudio	37
7.1.1. Características clínicas y antropométricas	37

7.1.2. Características de los individuos diabéticos.	38
7.2 Estado redox	40
7.2.1. Capacidad antioxidante y marcadores de estrés	40
7.2.2. Actividad de las enzimas antioxidantes	43
7.2.3. Efecto de la acumulación de enfermedades metabólicas y el tabaquismo en el estado redox de los sujetos de estudio	44
7.2.4. Efecto del conjunto de enfermedades metabólicas en los marcadores de estrés y actividad de enzimas antioxidantes	47
7.2.5. Efecto del tipo de fármaco antidiabético en los marcadores del estado redox	50
7.3. Actividad transcripcional de Nrf2	51
7.4. Efecto de la carga genética en el estado redox	53
7.4.1. Genotipificación del polimorfismo rs4673	53
7.4.2. Genotipificación del polimorfismo rs4880	56
VIII. DISCUSIÓN	58
IX. CONCLUSIONES	67
X. PERSPECTIVAS	67
XI. BIBLIOGRAFÍA	68
XII. ANEXOS	83
Anexo 1. Consentimiento Informado	83
Anexo 2. Características de los sujetos diabéticos	87

## ABREVIATURAS

<b><math>\gamma</math>-GCL</b>	Enzima gamma glutamato cisteína ligasa
<b>8-OHdG</b>	8-hidroxi-2-desoxi-guanosina
<b>ADA</b>	Asociación Americana de Diabetes <i>(American Diabetes Association)</i>
<b>AGEs</b>	Productos finales de glicación avanzada <i>(Advanced glycation end products)</i>
<b>ARE</b>	Elementos de respuesta antioxidante <i>(Antioxidante response elements)</i>
<b>CAT</b>	Enzima catalasa
<b>CLIDDA</b>	Clínica de Detección y Diagnóstico Automatizado
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>COS-7</b>	Línea celular epitelial de riñón de mono inmortalizada
<b>C-T</b>	Colestero total
<b>CTRL</b>	Grupo control
<b>CTRL1</b>	Grupo de hipercontroles
<b>CTRL2</b>	Grupo de sujetos no diabéticos con síndrome metabólico
<b>CYBA</b>	Citocromo b-245, polipéptido alfa <i>(cytochrome b-245, alpha polypeptide)</i>
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DM2-C</b>	Grupo con diabetes mellitus tipo 2 – hiperglucemia controlada (hemoglobina glucosilada <7%)
<b>DM2-NC</b>	Grupo con diabetes mellitus tipo 2 – hiperglucemia no controlada (hemoglobina glucosilada >7%)
<b>DMT1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DMT2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
<b>EDTA</b>	Ácido etildiaminotetraacético
<b>ER</b>	Especies reactivas
<b>FID</b>	Federación Internacional de Diabetes
<b>GPx</b>	Enzima glutatión peroxidasa
<b>GR</b>	Enzima glutatión reductasa
<b>GSH</b>	Glutatión
<b>GSSG</b>	Glutatión disulfuro

<b>GST</b>	Enzima glutati3n-S-transferasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Per3xido de hidr3geno
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glucosilada
<b>HDL</b>	Lipoprote3na de alta densidad
<b>HO-1</b>	Enzima hemo-oxigenasa 1
<b>HOMA-IR</b>	Modelo de estimaci3n de resistencia a la insulina ( <i>homeostatic model assessment-insulin resistance</i> )
<b>HRLALM</b>	Hospital regional Lic. Adolfo L3pez Mateos
<b>IMC</b>	3ndice de masa corporal
<b>INSP</b>	Instituto Nacional de Salud P3blica
<b>ISSSTE</b>	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
<b>Keap1</b>	Prote3na 1 asociada al dominio tipo Kelch-ECH (del ingl3s Kelch-like ECH-associated protein 1)
<b>LDL-C</b>	Lipoprote3na de baja densidad
<b>MDA</b>	Malondialdeh3do
<b>MPO</b>	Enzima mieloperoxidasa
<b>MT</b>	Metalotione3na
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato reducido
<b>NBT</b>	Azul de nitrotetrazolio
<b>NDA</b>	2,3-Naftal3n-dicarboxialdeh3do
<b>NO•</b>	Radical 3xido n3trico
<b>NOS</b>	Enzima sintasa de 3xido n3trico
<b>NOX</b>	Enzima NADPH oxidasa
<b>NQO1</b>	Enzima NADPH: quinona oxidorreductasa-1
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear relacionado al factor eritroide tipo 2
<b>O<sub>2</sub>•-</b>	Radical an3n super3xido
<b>OH•</b>	Radical hidroxilo
<b>p22phox</b>	Subunidad de la enzima NOX: cadena ligera b del citocromo de neutr3filo humano
<b>PAD</b>	Presi3n arterial diast3lica
<b>PAS</b>	Presi3n arterial sist3lica
<b>PKB/Akt</b>	Prote3na cinasa B
<b>PKC</b>	Prote3na cinasa C

<b>PRE</b>	Grupo de prediabéticos
<b>PRE1</b>	Sujetos prediabéticos no fumadores, sin síndrome metabólico
<b>PRE2</b>	Sujetos prediabéticos fumadores, con síndrome metabólico
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido <i>(Single Nucleotide Polymorphism)</i>
<b>SOD-1</b>	Enzima superóxido dismutasa-1
<b>TAS</b>	Estado antioxidante total <i>(Total antioxidant status)</i>
<b>T-G</b>	Triglicéridos
<b>TNB</b>	Ácido tionitrobenzoico
<b>TrX</b>	Tiorredoxina
<b>TrxR</b>	Enzima tiorredoxina reductasa
<b>UTR</b>	Región genética no traducida

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Criterios de diagnóstico de diabetes por la OMS y la ADA.	3
<b>Tabla 2.</b> Criterios de diagnóstico para la prediabetes.	5
<b>Tabla 3.</b> Características clínicas y antropométricas de los sujetos control (CTRL), prediabéticos (PRE) y diabéticos (DM2).	37
<b>Tabla 4.</b> Niveles de glucosa y hemoglobina glucosilada de acuerdo al tratamiento antidiabético referido por los sujetos diabéticos.	39
<b>Tabla 5.</b> Características de los pacientes diabéticos de acuerdo a los niveles de hemoglobina glucosilada	40
<b>Tabla 6.</b> Asociaciones de marcadores del estado redox y actividades antioxidantes con la edad, el sexo, el IMC, glucosa y la hemoglobina glucosilada en pacientes diabéticos.	42
<b>Tabla 7.</b> Criterios de división de los grupos de estudio para evaluar el efecto de la acumulación de enfermedades metabólicas y el tabaquismo en el estado redox.	44
<b>Tabla 8.</b> Características clínicas y antropométricas de los grupos divididos de acuerdo a la presencia de 1 o más enfermedades metabólicas.	46
<b>Tabla 9.</b> Asociaciones significativas de marcadores del estado redox y actividades antioxidantes en pacientes diabéticos.	49
<b>Tabla 10.</b> Efecto del fármaco antidiabético en los marcadores del estado redox en los pacientes diabéticos incluidos en el estudio.	50
<b>Tabla 11.</b> Asociaciones de los niveles de Nrf2 con la hemoglobina glucosilada, edad, hospitalización, y el estrés oxidante.	52
<b>Tabla 12.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismo C242T (rs4673) en pacientes diabéticos y no diabéticos.	53
<b>Tabla 13.</b> Asociación del genotipo con la hemoglobina glucosilada.	54
<b>Tabla 14.</b> Asociación del polimorfismo rs4673 con la hemoglobina glucosilada.	55
<b>Tabla 15.</b> Características de los grupos no diabéticos y diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs4673.	56
<b>Tabla 16.</b> Características de los grupos no diabéticos y diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs4880.	57

<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS</b>	Página
<b>Figura 1.</b> El octeto ominoso de la diabetes.	8
<b>Figura 2.</b> Estructura de la enzima NADPH oxidasa-2.	12
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de defensa antioxidante.	14
<b>Figura 4.</b> Sistema Nrf2-Keap1.	17
<b>Figura 5.</b> Integración del desbalance redox en los pacientes prediabéticos y diabéticos.	23
<b>Figura 6.</b> Capacidad antioxidante y marcadores de estrés.	41
<b>Figura 7.</b> Actividad de las enzimas antioxidantes.	43
<b>Figura 8.</b> Capacidad antioxidante y marcadores de estrés en grupos clasificados por la presencia de una o más enfermedades metabólicas.	47
<b>Figura 9.</b> Actividad de las enzimas antioxidantes en individuos clasificados por la presencia de una o más enfermedades metabólicas.	48
<b>Figura 10.</b> Ensayo de actividad transcripcional de Nrf2.	51
<b>Figura 11.</b> Integración de los resultados en los individuos prediabéticos y diabéticos.	66
<b>Diagrama 1.</b> Tamaño de la muestra en cada etapa.	26

## RESUMEN

**Antecedentes:** La diabetes mellitus es catalogada actualmente como una epidemia de dimensiones mundiales y por sus complicaciones, es la primera causa de muerte en México.

Se ha reconocido que el estrés oxidante juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia a insulina y de las complicaciones secundarias de la diabetes.

El factor de transcripción relacionado al factor nuclear eritroide 2 NF-E2 (Nrf2), se considera el regulador maestro de la respuesta antioxidante, ya que promueve la transcripción de diversas enzimas antioxidantes, entre ellas, las encargadas de la síntesis de glutatión. En modelos animales, su activación protege a las células  $\beta$ -pancreáticas de la muerte celular, disminuye la resistencia a insulina, mejora el control glicémico y tiene efecto protector ante el desarrollo de complicaciones secundarias.

**Hipótesis:** El incremento de estrés oxidante en los individuos diabéticos estará asociado a una menor actividad de Nrf2 en las células mononucleares de sangre periférica.

Además, el desarrollo de estrés oxidante en la diabetes se asociará con polimorfismos en los genes de las enzimas NADPH oxidasa y superóxido dismutasa.

**Objetivo:** Determinar los factores clínicos y antropométricos asociados al progreso de estrés oxidante y que contribuyen al desarrollo de diabetes tipo 2 en una muestra de población Mexicana.

**Metodología:** Se trató de un estudio transversal de controles y casos con prediabetes y diabetes tipo 2. Se midió la capacidad antioxidante total, las concentraciones de malondialdehído y glutatión, así como la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa, glutatión reductasa en el plasma sanguíneo, y  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa y superóxido dismutasa en eritrocitos. Se determinó si las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en el gen de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa (rs4673) y de la enzima superóxido dismutasa (rs4880) se asocian con la diabetes. En núcleos de células mononucleares de sangre periférica, se determinó la actividad transcripcional de Nrf2. Bajo esta estrategia se estableció si existe alguna falla en la activación de Nrf2 para promover la respuesta antioxidante endógena en la diabetes. Las mediciones se realizaron en 259 controles, 183 casos y 116 prediabéticos según los criterios de diagnóstico de la Asociación Americana de

Diabetes (2011). Se les determinó la química sanguínea, biometría hemática y se extrajo el DNA para la genotipificación.

**Resultados:** No se observó un desbalance redox en los pacientes prediabéticos, sin embargo, se encontró una menor actividad transcripcional de Nrf2 en las células mononucleares de sangre periférica de estos pacientes respecto a los sujetos no controles. En los individuos diabéticos, se observó una disminución de las defensas antioxidantes, principalmente en la producción de glutatión y la capacidad antioxidante total en plasma y eritrocitos, así como un incremento de malondialdehído en plasma y de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos. Los niveles de Nrf2 en los pacientes diabéticos con pobre control glucémico (hemoglobina glucosilada >7%) fueron inferiores respecto a los sujetos control, lo que sugiere que la disminución transcripcional de Nrf2 podría preceder al desarrollo de estrés oxidante durante la diabetes. Por tanto, un común denominador de la modulación del estado redox fue el control de la enfermedad determinado por los niveles de hemoglobina glucosilada en los sujetos diabéticos, sugiriendo que el control de la hiperglucemia tiene un efecto positivo en el control del estrés oxidante durante la diabetes. Finalmente, los estudios de regresión sólo mostraron asociación del polimorfismo rs4673 en el gen de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa con la diabetes.

**Conclusión:** En los pacientes prediabéticos y diabéticos se observó menor actividad transcripcional de Nrf2 en las células mononucleares de sangre periférica, lo que sugiere que la disminución de Nrf2 podría preceder al desarrollo de estrés oxidante desde la prediabetes. Sin embargo, la variabilidad en los niveles de este factor no se pudo explicar del todo por los marcadores de estrés evaluados en plasma y eritrocitos. Finalmente, sólo el polimorfismo rs4673 en el gen de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa, se encontró significativamente asociado con la hemoglobina glucosilada.

## I. INTRODUCCIÓN

La cantidad de personas con diabetes en el mundo incrementa en una proporción tal que supera las estimaciones realizadas por instancias internacionales. En el año 2000, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaba que para el año 2030 las personas con diabetes en el mundo alcanzarían la cifra de 366 millones de personas. Sin embargo, en la última estimación de la Federación Internacional de Diabetes (FID), esta cifra ha sido superada para el año 2013. Aunado al hecho de que aproximadamente la mitad de esta cifra corresponde a personas diabéticas aún no diagnosticadas, se considera que para el año 2015 habrán alrededor de 450 millones de personas en el mundo que sufrirán de alguna complicación secundaria de la diabetes si el control glucémico es deficiente.

La diabetes mellitus es una enfermedad multifactorial en la cual factores ambientales como la alimentación, el sedentarismo, el medio ambiente, entre otros, se conjugan con factores genéticos que predisponen a ciertos individuos a padecer la enfermedad. Así mismo, el estrés oxidante juega un papel muy importante en el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones.

Recientes investigaciones *in vivo* se han enfocado en el papel del factor de transcripción relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) en el desarrollo de resistencia a la insulina y las complicaciones propias de la diabetes. Sin embargo, poco se sabe de su papel en humanos tanto en etapas previas a la diabetes (prediabetes) como en el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones.

En la búsqueda de nuevos blancos de la enfermedad que sirvan como predictores de la misma, así como posibles blancos terapéuticos, no se ha descartado el uso de antioxidantes para contrarrestar los efectos oxidantes de la hiperglucemia. Por tanto, resulta importante el estudio de los factores tanto ambientales como genéticos que contribuyen a la modulación de marcadores circulantes del estado redox en la población mexicana.

Además, ya que Nrf2 es considerado como el regulador maestro de la respuesta endógena antioxidante, el establecer si éste se encuentra modificado durante etapas previas y posteriores al desarrollo de la diabetes, permitirá la apertura de una nueva vía de estudio e intervención de la enfermedad.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1. Diabetes mellitus**

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia, debida a una deficiencia en la secreción y/o acción de la insulina. La hiperglucemia crónica provoca alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, las proteínas y las grasas (Thomas y Philipson, 2015). Se trata una enfermedad crónica, degenerativa y progresiva que conlleva a la disminución de la esperanza de vida en quienes la padecen, ya que se asocia con múltiples complicaciones micro y macrovasculares.

#### **2.1.1. Prevalencia**

La Federación Internacional de Diabetes (FID) estimó que para el año 2012 habían 382 millones de adultos (8.3%) con diabetes en el mundo entero y para el año 2035, el número de personas diabéticas incrementaría a 592 millones (FID, 2013).

México se encuentra entre los primeros 10 países con mayor número de diabéticos. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, emitida por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), la prevalencia nacional de diabetes por diagnóstico médico en adultos fue de 7.0 % (7.3% mujeres y 6.5% hombres). A nivel nacional, el Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, el Estado de México, Tamaulipas y Durango presentan la prevalencia más alta de diabetes (de 10.2 a 12.3%) (INSP, 2012).

Por tanto, se ha originado un gran problema de salud pública y elevados costos para el sector salud debido a que quienes la padecen acuden con mayor frecuencia a las unidades de atención médica, tienen una probabilidad mayor de ingresar a los servicios de urgencias y, debido a las múltiples complicaciones, requieren hospitalizaciones más prolongadas en comparación con los individuos que no son diabéticos (Fernández-Cantón, 2006).

#### **2.1.2. Diagnóstico**

Los criterios diagnóstico de la diabetes, así como los puntos de corte, han cambiado con el tiempo y varían dependiendo de la institución, siendo los de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Americana de Diabetes (ADA; por sus siglas en Inglés) los más utilizados (Tabla 1).

**Tabla 1.** Criterios de diagnóstico de diabetes por la OMS y la ADA.

Criterio	OMS 2006	ADA 2010
<i>Glucosa sérica en ayunas</i> (ayuno de 8 a 12 horas)	< 126 mg/dL (7 mmol/L)	≥ 126 mg/dL (7 mmol/L)
<i>Glucosa sérica de 2 h</i> tras carga oral de 75 de glucosa	< 200 mg/dL (11.1 mmol/L)	≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)
<i>Hemoglobina glucosilada en ayunas</i> (ayuno de 8 a 12 horas)	No lo considera	≥ 6.5 %
<i>Glucosa al azar</i> en pacientes con poliuria, polidipsia o polifagia	No lo considera	≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

Abreviaturas. OMS: Organización mundial de la Salud, ADA: Asociación Americana de diabetes.

Ambas organizaciones incluyen como criterios de diagnóstico los niveles de glucosa plasmática, ya sea en ayunas (de 8 a 12 horas de ayuno) o a las 2 horas tras una carga oral de 75 g de glucosa. Sin embargo, la ADA propuso la inclusión de la hemoglobina glucosilada como un tercer criterio de diagnóstico (International Expert Committee, 2009) y recomienda la medición de glucosa al azar cuando los pacientes presentan síntomas propios de la hiperglicemia tal como mareos frecuentes, polidipsia, poliuria y polifagia (ADA, 2014).

### 2.1.3. Tipos de diabetes

Ningún esquema de clasificación es ideal, sin embargo, los esquemas actuales dan información sobre la causa, la historia natural, la genética, la heredabilidad, el fenotipo clínico y las terapias óptimas. Según la ADA (2014), la diabetes se clasifica en 4 grupos:

**a) La diabetes tipo 1.** Debido a la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas por mecanismos autoinmunes, o bien, por etiología desconocida (diabetes idiopática). Usualmente, conlleva a la deficiencia absoluta de la producción de insulina.

**b) La diabetes de tipo 2.** Resulta de un defecto progresivo en la secreción de la hormona insulina y/o en su acción provocando resistencia a la misma.

**c) Otros tipos específicos de diabetes.** Debido a otras causas como:

- Defectos monogénicos de la función de las células  $\beta$ . Incluye a los tres tipos de diabetes de comportamiento adulto en la etapa juvenil (MODY, por sus siglas en inglés).
- Defectos genéticos como mutaciones del receptor de la insulina o de proteínas que se encuentran río abajo en la vía de señalización de la misma. Puede variar de la hiperinsulinemia y la hiperglucemia modesta a la diabetes severa.
- Enfermedades del páncreas exocrino debido a cualquier proceso que lo daña de forma difusa. Incluye enfermedades como pancreatitis, trauma, infección, pancreatectomía, fibrosis quística y el carcinoma de páncreas.
- Endocrinopatías, debido al incremento en la producción y acción de varias hormonas (por ejemplo, la hormona del crecimiento, cortisol, glucagón, epinefrina), las cuales antagonizan la acción de la insulina. Incluyen enfermedades como por ejemplo la acromegalia, el síndrome de Cushing, glucagonoma y feocromocitoma.
- Inducido por fármacos o productos químicos. Algunos de los productos identificados que inducen este tipo de diabetes incluyen vacor, la pentamidina, el ácido nicotínico, los glucocorticoides la hormona tiroidea, diazóxido, agonistas adrenérgicos, las tiazidas, dilantin y  $\alpha$ -interferón.
- Infecciones por ciertos virus se han asociado con la destrucción de las células  $\beta$ . Se han asociado con enfermedades víricas como la rubéola congénita y las paperas, y las causadas por el virus de Coxsackie B, el citomegalovirus y el adenovirus.
- Formas poco frecuentes de diabetes inmunológica. El incremento de anticuerpos anti glutamato descarboxilasa (síndrome del hombre rígido) y anticuerpos anti receptor de la insulina puede desencadenar diabetes.
- Otros síndromes genéticos por anomalías cromosomales como el síndrome de Down, el síndrome de Klinefelter, el síndrome de Turner, el síndrome de Wolfram, el síndrome de Prader-Willi y el síndrome de Laurence-Moon-Biedl, la ataxia de Friedreich, corea de Huntington, la distrofia miotónica y la porfiria.

**d) Diabetes gestacional.** cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio en el embarazo.

## 2.2. Prediabetes

A partir del año 2003, la ADA a través del comité experto en el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus, reconoció un grupo de individuos cuyos valores de glucosa en ayunas no se encuentran dentro de los valores de clasificación y diagnóstico de la diabetes (Tabla 2), sin embargo, se encuentran en rangos más elevados como para ser considerados normoglicémicos (Genuth y col., 2003).

**Tabla 2.** Criterios de diagnóstico para la prediabetes.

Criterio	Normal	Prediabetes
<i>Glucosa sérica en ayunas</i> (ayuno de 8 a 12 horas)	≤ 99 mg/dL (5.5 mmol/L)	100 a 125 mg/dL (5.6 a 6.9 mmol/L)
<i>Hemoglobina glucosilada en ayunas</i> (ayuno de 8 a 12 horas)	≤ 5.6	5.7 a 6.4%
<i>Glucosa sérica de 2 h</i> tras carga oral de 75 de glucosa	≤139 mg/dL (7.7 mmol/L)	140 a 199 mg/dL (7.8 -11.0 mmol/L)

*(ADA, 2014)*

El término “prediabetes” ha sido muy criticado debido a que algunos individuos en esta etapa no siempre progresan a diabetes. En este sentido, la OMS utiliza el término “hiperglucemia intermedia” y la ADA la define como “estado de alto riesgo de desarrollar diabetes”. En si el término “prediabetes” se utiliza para personas con glucosa alterada en ayunas y/o intolerancia a la glucosa, lo cual incrementa el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. Sin embargo, estas dos alteraciones están asociadas también a un conjunto de enfermedades metabólicas como la obesidad (abdominal o visceral), dislipidemias e hipertensión, por lo que diagnosticar la prediabetes con los valores de glucosa en ayunas o la intolerancia a la glucosa resulta insuficiente.

Debido a lo anterior, la ADA sugiere incluir la medición de hemoglobina glucosilada. En una revisión sistemática de 16 estudios con 44,203 individuos con un promedio de seguimiento de 5.6 años, observaron que aquellos que se encontraban en el rango de hemoglobina glucosilada de 5.5 a 6.0% tuvieron un riesgo relativo de incidencia de diabetes (9 a 25%) en más de 5 años. Sin embargo, aquellos que tuvieron niveles de hemoglobina glucosilada entre el rango de 6.0 a 6.5%, incrementaron el riesgo de incidencia de diabetes (25 a 50%), en el mismo periodo de

tiempo (Zhang y col., 2010; Ackermann y col., 2011). De acuerdo a la ADA (2014), el 70% de los individuos con prediabetes eventualmente progresará a diabetes tipo 2.

### **2.3. Diabetes tipo 2**

La diabetes tipo 2 representa del 90 al 95% de los casos de diabetes. En México, el diagnóstico de diabetes es muy deficiente, ya que en muchas instituciones de salud pública aún se utiliza la clasificación antigua de diabetes juvenil (o insulino dependiente) y diabetes del adulto (no insulino dependiente). Sin embargo, debido al incremento de la obesidad y el sedentarismo, muchos jóvenes menores de 30 años presentan diabetes tipo 2.

Para un diagnóstico y tratamiento certero, es importante entender la fisiopatología de la enfermedad, área que en la actualidad es un enorme campo de investigación.

#### **2.3.1. Fisiopatología de la diabetes tipo 2**

El mantenimiento de una concentración adecuada de glucosa en plasma requiere una adaptación precisa de la utilización de glucosa y su producción endógena o la proveniente de la dieta (Giugliano y col., 2008). Los niveles de glucosa en ayunas se mantienen entre los 70 y 100 mg/dL, gracias a la regulación coordinada de diferentes hormonas (Abdul-Ghani y col., 2006).

La insulina, es una hormona esencial que regula la concentración de glucosa en plasma principalmente mediante la restricción de la producción de glucosa hepática. La hormona glucagón actúa en el hígado para aumentar la producción de glucosa hepática en cuestión de minutos. La ingestión de hidratos de carbono provoca un aumento rápido en la concentración de insulina y una disminución en la concentración de glucagón. Por tanto, la pronta liberación de insulina permite la utilización de glucosa durante la absorción y evita la hiperglucemia (Matsuda y col., 2002; Rafacho y col., 2014).

La deficiencia en la secreción o acción de la insulina provoca el incremento de las concentraciones de glucagón, lo que aumenta la producción de glucosa por el hígado (hiperglucemia basal). La disminución absoluta en la concentración de insulina en plasma o su acción, reduce la utilización de glucosa en los tejidos periféricos (hiperglucemia postprandial) (Giugliano y col., 2008).

Por varias décadas se sostuvo la idea de que los sujetos con diabetes tipo 2 presentaban dos principales defectos (DeFronzo, 2004): el aumento de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético y en hígado, y el deterioro progresivo de la función de las células  $\beta$ .

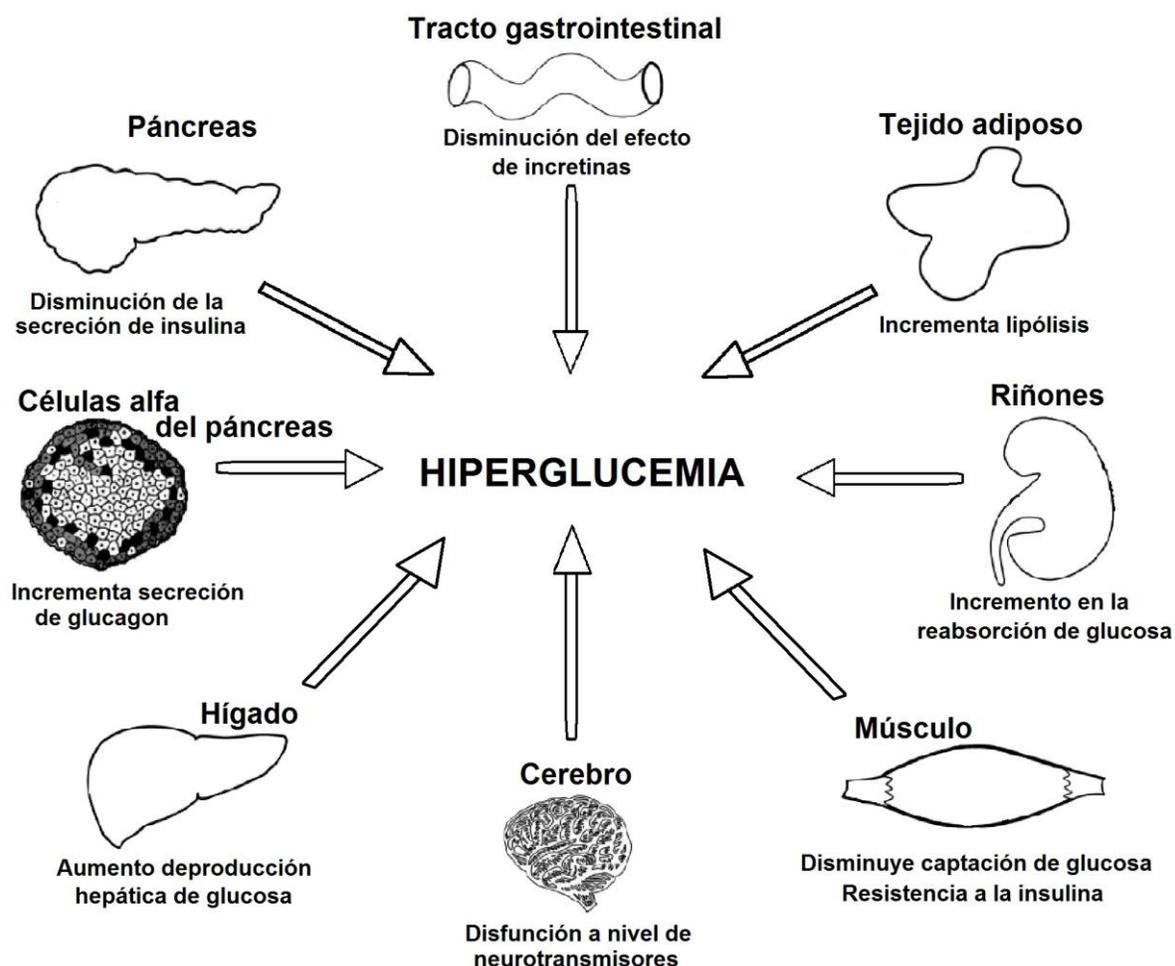
El aumento de la resistencia a la insulina se produce a principios de la historia natural de la diabetes tipo 2, pero se compensa con el aumento de la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ . Cuando estas células son incapaces de producir insulina, ya no se puede compensar la resistencia a esta hormona y se deteriora la homeostasis de la glucosa. Inicialmente, esto se manifiesta como intolerancia a la glucosa y puede evolucionar hasta una diabetes manifiesta (Abdul-Ghani y DeFronzo, 2009).

La mayoría de los individuos obesos (70% aproximadamente), tienen resistencia a la insulina que va de moderada a grave. Sin embargo, debido al aumento de secreción de insulina por las células  $\beta$ , la mayoría puede mantener la homeostasis de la glucosa en niveles normales. Por lo tanto, la resistencia a la insulina por sí sola no es suficiente para el desarrollo de diabetes tipo 2. Se requiere pérdida progresiva de la función de las células  $\beta$  del páncreas para promover el deterioro de la homeostasis de la glucosa y el consecuente desarrollo de la hiperglucemia (DeFronzo y Abdul-Ghani, 2011).

En una revisión actualizada de la patogenia de la diabetes tipo 2 De Fronzo (2009) menciona hasta ocho mecanismos a los que denomina "el octeto ominoso", por la participación no sólo del músculo, hígado y células  $\beta$  del páncreas, sino también las células del tejido adiposo, el tracto gastrointestinal, las células  $\alpha$  del páncreas, el riñón y el cerebro. Este octeto juega un papel importante en el desarrollo de la intolerancia a la glucosa en los individuos con diabetes tipo 2 (Figura 1).

Si bien, se sabe que durante la diabetes tipo 2 existe un incremento en la producción de glucagón, no era de esperarse que se reconociera a las células  $\alpha$  del páncreas en la patogenia de la enfermedad (Matsuda y col., 2002). Así mismo, se ha reconocido que el tejido adiposo, el cual es resistente al efecto de la insulina, puede conducir a la elevación de la concentración de ácidos grasos libres en plasma. Si este estado persiste, se estimula la gluconeogénesis induciendo la resistencia a la insulina en hígado y músculo, lo que puede dañar a largo tiempo la secreción de insulina (Bays y col., 2004).

Por otro lado, las incretinas juegan un papel importante en la secreción de insulina y por tanto, en la disminución de la producción de glucagón. Dos de las incretinas secretadas en el intestino durante los periodos de alimentación son el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) y el polipéptido inhibidor gástrico (GIP). En la diabetes tipo 2 se ha observado que la producción de GLP-1 es deficiente (Kjems y col., 2003), mientras que incrementa la resistencia del GIP a la estimulación de la secreción de insulina, aunque sus niveles sean elevados (Meier y col, 2001).



**Figura 1.** El octeto ominoso en la diabetes (*adaptado de DeFronzo, 2009*).

Se ha observado una respuesta adaptativa del riñón para conservar la glucosa necesaria para satisfacer las demandas del cuerpo, por lo que ésta se reabsorbe. El cerebro y otros tejidos neurales, principalmente, demandan más del 50% de glucosa (Abdul-Ghani, 2013). Aunado a esto, se ha documentado que durante la diabetes

existe un déficit de producción y/o acción de neurotransmisores, principalmente los involucrados en el control del apetito y la saciedad (Brunning y col., 2000).

No todos estos mecanismos se manifiestan en todos los pacientes, por ello es importante la medición de marcadores que evidencien su presencia en el individuo para la implementación de un mejor tratamiento.

### **2.3.2. Complicaciones de la diabetes tipo 2**

De acuerdo a su fisiopatología, es de esperar que los órganos implicados en el desarrollo de la diabetes y aquellos en contacto con las altas concentraciones de glucosa se vean afectados por la hiperglucemia persistente.

Las complicaciones agudas de la diabetes incluyen cetoacidosis causada por hiperglucemia y coma diabético, debido a eventos de hipoglucemia. Las altas concentraciones de glucosa en circulación durante largos periodos de tiempo (años) provocan daño en los vasos sanguíneos y el desarrollo de diferentes patologías en diferentes órganos (Forbes y Cooper, 2013).

Las complicaciones secundarias crónicas de la diabetes se dividen en dos grupos: complicaciones macrovasculares y microvasculares. Las primeras se originan por el daño a las arterias e incluyen la enfermedad cardiovascular, que provoca infarto al miocardio, y la enfermedad cerebrovascular. Las complicaciones microvasculares, en las cuales los pequeños vasos sanguíneos se dañan por la hiperglucemia, provocan el desarrollo de retinopatía, nefropatía, neuropatía, uropatías, enfermedades respiratorias y enfermedades asociadas a la función neurológica como la depresión y demencia (Stratton y col, 2000).

En la ENSANUT 2012, el tipo de complicación más reportada por los diabéticos mexicanos, fue la visión disminuida (47.6%) que se refleja también en daño a la retina (13.9%) y pérdida de la vista (6.6%). La presencia de úlceras ocurrió en 7.2% de los pacientes, 2.9% reportó haber padecido un coma diabético y 2.8% haber padecido un infarto (INSP, 2012).

El progreso de las complicaciones en los pacientes diabéticos depende del control de la hiperglicemia, de factores genéticos y ambientales, como el tipo de alimentación y sedentarismo. Desde hace más de una década, se reconoce el papel del estrés oxidante tanto en el desarrollo de diabetes, como en el desarrollo de sus complicaciones.

## **2.4. Estrés oxidante en la diabetes mellitus**

El estrés oxidante se define como la producción excesiva de especies reactivas y/o una disminución del sistema antioxidante. Entre las especies reactivas se encuentran las de oxígeno (ERO) y las de nitrógeno (ERN), y tienen oxígeno o nitrógeno incompletamente reducido por lo que son más reactivas que sus formas moleculares. Los radicales libres, en cambio, los radicales libres pueden ser definidos como moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones no apareados en su órbitas moleculares, por lo que incrementa considerablemente su grado de reactividad (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Hoy en día se reconoce que las especies reactivas en las concentraciones adecuadas son esenciales para diversos procesos biológicos tal como la regulación transcripcional dependiente del estado redox, transporte de iones y fosforilación de proteínas (Rhee y col., 2005).

La mitocondria es la principal fuente de EROs, en donde el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se producen en células aeróbicas durante la respiración mitocondrial (Forman y col., 2002). Bajo condiciones de estrés oxidante, la especies reactivas que no se reducen o se remueven del entorno celular, pueden causar daño a macromoléculas como a los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, provocando así daño oxidante (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Actualmente se reconoce que el estrés oxidante está involucrado en la patogénesis de la DM y de manera importante, en el desarrollo de sus complicaciones.

### **2.4.1. Mecanismos generales de estrés oxidante en el desarrollo de diabetes**

Si bien, los mecanismos por los cuales las especies reactivas contribuyen al desarrollo de diabetes dependen en gran manera de las células en donde se produzca el daño y la maquinaria endógena antioxidante. Se pueden enlistar tres mecanismos generales en por los cuáles las especies reactivas contribuyen al desarrollo de diabetes: la disfunción mitocondrial, el incremento de anión superóxido y la disminución de la defensa antioxidante.

#### ***a) Disfunción mitocondrial***

La principal función fisiológica de la mitocondria es la generación de adenosín trifosfato (ATP) por medio de la fosforilación oxidativa. Algunas funciones adicionales

incluyen la generación y la desintoxicación de especies reactivas del oxígeno, la participación en algunas formas de apoptosis, la regulación del calcio citoplasmático y de la matriz mitocondrial, la síntesis y el catabolismo de los metabolitos. Alguna anomalía en cualquiera de estos procesos puede ser denominada disfunción mitocondrial (Brand y Nicholls, 2011).

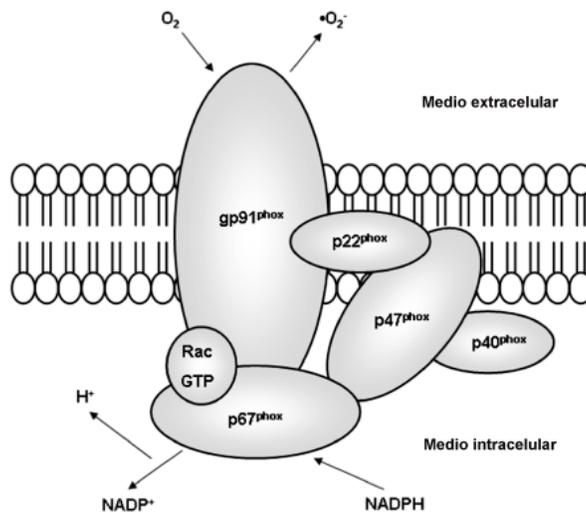
En la cadena transportadora de electrones, se ha observado un incremento de producción de anión superóxido, principalmente a través de los complejos I y III (Chen y col., 2003). Los radicales superóxido se reducen a  $H_2O_2$  en la mitocondria por la acción de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial, la cual es dependiente de manganeso. Posteriormente, el  $H_2O_2$  es posteriormente reducido a agua por la acción de la enzima glutatión peroxidasa.

En las células  $\beta$ , los niveles de glutatión peroxidasa y catalasa (enzima que reduce el  $H_2O_2$  a  $H_2O$ ) son muy bajos comparados con los niveles en hígado (99% más bajos) (Rhee y col., 2005). Cuando la producción de  $H_2O_2$  es mayor que la capacidad de reducirlo, se acumula y se produce el radical hidroxilo ( $\bullet HO$ ) vía reacción de Fenton (Ma y col., 2012). Si no se eliminan rápidamente, las especies reactivas pueden producir hipertrofia de la mitocondria, además de promover la fragmentación del ADN, la nitración de proteínas, la peroxidación de los fosfolípidos de membrana y promover la apoptosis (Fariss y col., 2005, Marchetti y col., 2010; Orrenius, 2004).

Se ha documentado que la producción de  $H_2O_2$  en mitocondrias de músculo esquelético, promueve la resistencia a la insulina. En tejidos de animales con resistencia a insulina, inducida por una dieta alta en grasas, y en biopsias de sujetos con obesidad mórbida, el desarrollo de resistencia a insulina se asoció con un incremento en el potencial de emisión de  $H_2O_2$  así como una menor capacidad de reducción comparado con los grupos controles, sensibles a insulina (Anderson y col., 2009).

### ***b) Producción de superóxido por NADPH oxidasas***

Las oxidasas dependientes de NADPH (Nox), son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde el NADPH hasta el oxígeno molecular para generar el radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) en el medio extracelular (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura de la enzima NADPH oxidasa-2 (Rabêlo y col., 2010).

Los miembros de la familia de las Nox varían entre sí dependiendo de las subunidades citosólicas y de membrana. Existen 5 isoformas de la enzima y las primeras 4 tienen en común que interactúan con la subunidad p22<sup>phox</sup> y sus niveles en la célula varían ante un estado patológico. La isoforma 1 se expresa principalmente en el músculo liso y el endotelio. La Nox2, se expresa en células blancas, en el endotelio y cardiomiocitos. Nox3 se encuentra en tejido fetal y el oído interno adulto y está implicado en la función vestibular. La isoforma 4, se expresa altamente en el riñón y también está presente en el endotelio, músculo liso, islotes pancreáticos y fibroblastos, siendo el único que no parece requerir componentes citosólicos en su actividad, sino que parece ser activado constitutivamente (Geiszt, 2006; Bedard y Krause, 2007). Nox5 es la más recientemente identificada, es sensible a calcio y que no requiere ninguna subunidades (como las isoformas anteriores) para su activación y se encuentra en los testículos, bazo y células vasculares (Banfi y col. 2001; Sumimoto, 2008).

Estas enzimas contribuyen a numerosos procesos biológicos y patológicos que incluyen audición y el equilibrio (Nox3), la regulación de la presión arterial, la inflamación, el crecimiento celular (Nox1/Nox2) y diferenciación (Nox4). La función exacta de Nox5 vascular es desconocida, pero puede regular el crecimiento y la migración y se ha implicado en la aterosclerosis (Bedard y Krause, 2007). Las isoformas 1,2 y 4 de NOX se expresan en las células  $\beta$  pancreáticas. A pesar de que las funciones específicas de cada isoforma aún no se han dilucidado, su actividad se ha asociado a la secreción de insulina (Uchizono, 2006; Nakayama y col., 2005).

La generación de especies reactivas modula la secreción de insulina estimulada por la glucosa; teniendo un efecto positivo ante la activación aguda de especies reactivas, pero un efecto negativo sobre su activación crónica (Newsholme y col., 2009). En modelos animales, cuando se inhibe esta enzima, se observó que su actividad se requiere para estimular la secreción de insulina.

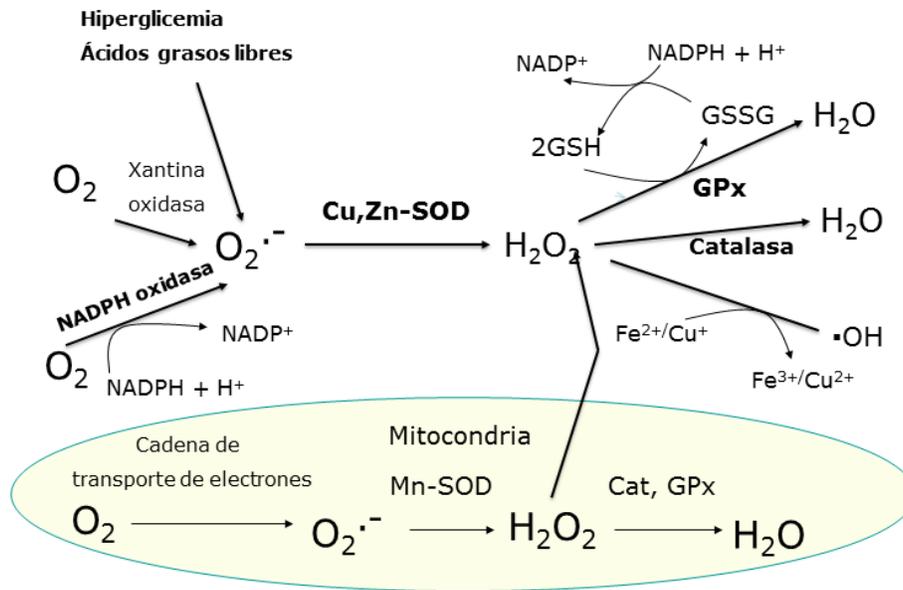
Los ratones deficientes en NOX-2, se observó protección contra la destrucción de las células  $\beta$  inducida por estreptozotocina (Xiang y col., 2010). Es posible que la actividad de la NOX-1 dependa de factores de inflamación, ya que estimulación en los islotes humanos, de ratón o en líneas celulares con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), la interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), y el interferón gamma (IFN $\gamma$ ), induce preferentemente la expresión de NOX-1, lo cual puede constituir un componente importante de la patogénesis de las células beta (Chang y col., 2009).

En tejido adiposo, la adiponectina puede inhibir la actividad de NADPH oxidasa y la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). Sin embargo, en sujetos obesos la expresión de adiponectina se ve disminuida por un incremento de factores pro inflamatorios y de especies reactivas, lo que favorece la producción de superóxido vía NADPH oxidasa (Evans y col., 2005; Tao y col., 2007).

### ***c) Disminución de las defensas antioxidantes***

Ante un estado de estrés oxidante, se activa el sistema de defensa antioxidante (Figura 3), el cual está formado por enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasa (GST), gama-glutamyl-cisteína ligasa ( $\gamma$ -GCL), tioredoxina reductasa (TrxR), NADPH: quinona oxidoreductasa (NQO1), hemo oxigenasa-1 (HO-1), mieloperoxidasa (MPO) y paraoxonasas (PON) y moléculas no enzimáticas como GSH, tioredoxina (TrX) y metalotioneina (MT). Sin embargo, hay enzimas pro-oxidantes, que catalizan la producción de especies reactivas, tal como NOX, xantina oxidasa (Xox) y sintasa de óxido nítrico (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Las células  $\beta$  del páncreas son altamente vulnerables al estrés oxidante por su baja expresión de enzimas antioxidantes que contrarresten los efectos de las especies reactivas. Esta condición contribuye, junto con la infiltración de factores pro inflamatorios, a la pérdida de función y consiguiente destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que se refleja en disminución de la secreción de insulina (Rochette y col., 2014).



**Figura 3.** Mecanismos de defensa antioxidante.

Cuando la resistencia a insulina está presente en el paciente diabético, la hiperglucemia es persistente y existe menor secreción de insulina se ha observado disminuciones concomitantes del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y de glutatión, lo que conlleva a un desbalance del estado redox y disminución de enzimas antioxidantes (Rolo y Palmeira, 2006). También se ha observado incremento en la lipoperoxidación de membranas cuya producción es directamente proporcional a la concentración de glucosa en sangre y hemoglobina glucosilada (Jain y col., 1989).

Diversos estudios sostienen la idea de que la insulina tiene un efecto antioxidante para proteger a células y órganos en contra del daño causado por estrés oxidante. Previene de la muerte por necrosis y apoptosis causada por especies reactivas en varios tipos celulares, como hepatocitos, células  $\beta$ , células neuronales y endoteliales (Hermann y col., 2000; Kang y col., 2003; Duarte y col., 2008). Los mecanismos por los cuáles se genera la protección vía incremento de defensas antioxidantes se atribuyen en gran manera al factor de transcripción nuclear eritroide 2 NF-E2 (Nrf2), cuya participación se menciona en el apartado 2.5.

#### **2.4.2. Estrés oxidante y el desarrollo de complicaciones secundarias de la diabetes**

El estrés oxidante puede originarse de diferentes fuentes y se ha documentado que las especies reactivas de oxígeno se producen en mayores cantidades en los islotes de pacientes con diabetes tipo 2 (Marchetti y col., 2004). Aunado a esto, la obesidad, la hipertensión, las dislipidemias y la hiperglicemia se asocian con el incremento de especies reactivas e incrementan el riesgo de padecer complicaciones micro y macro vasculares (Henriksen y col., 2011; Tumova y col., 2013).

En la mitocondria de células endoteliales, las altas concentraciones de glucosa pueden activar varias cascadas de señalización que incluyen la activación de NADPH oxidasas, xantina oxidasa y sintasa de óxido nítrico desacoplada, las cuales producen el anión superóxido, (Schaffer y col., 2012).

El endotelio provee una fuente constitutiva de óxido nítrico y bajo condiciones de inflamación y estrés oxidante se puede producir un exceso a partir de la sintasa de óxido nítrico inducible (Pacher y col., 2005). Cuando el radical superóxido reacciona con el óxido nítrico se produce peroxinitrito, el cual induce daño celular al inducir la nitrotiración de diferentes proteínas en el endotelio, lo que contribuye al desarrollo de complicaciones micro y macro vasculares (Pacher y Szabó, 2006).

Las fluctuaciones en las concentraciones de la glucosa son la principal causa de disfunción endotelial, ya que inducen mayor producción de radical superóxido y  $H_2O_2$ , provocando disminución del sistema antioxidante y daño molecular (Ceriello y col., 2008; Schaffer y col., 2012). Los mecanismos por los cuales la producción aumentada de especies reactivas puede causar daño se resumen en los siguientes (Johnson, 2012; Pitocco y col., 2013).

- a) Activación de la vía de los polioles. Bajo una serie de reacciones se obtiene fructosa a partir de la glucosa, a partir de la enzima aldosa reductasa. Esta vía consume NADPH, el cual queda menos disponible para el metabolismo de glutatión.
- b) Formación incrementada de productos finales de glucosilación avanzada. A partir de la reacción no enzimática de la glucosa con proteínas. El receptor de estas las proteínas glucosiladas induce la producción de superóxido vía activación de NADPH oxidas y a su vez pueden activar factores de inflamación causando cambios morfológicos a nivel celular.

- c) Activación de la proteína quinasa C (PKC). Algunas isoformas de PKC pueden activar la producción de óxido nítrico en células de músculo liso e induce la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), promoviendo la permeabilidad vascular.
- d) Activación de la vía de las hexosaminas. La resistencia a la insulina y la hiperglicemia inducen a la producción de anión superóxido el cual provoca la oxidación de ácidos grasos, incrementando el flujo de fructosa-6-fosfato a la vía de hexosaminas.

Estas vías tienen en común que el estrés oxidante participa en ellas contribuyendo en gran manera al desarrollo de complicaciones secundarias de la diabetes. En este sentido, durante la década pasada, las investigaciones se enfocaron en el uso de antioxidantes como terapia sustitutiva para el tratamiento tanto de la diabetes como de sus complicaciones. A partir del año 2007, se ha puesto mucha atención a la participación de Nrf2 como un blanco terapéutico para prevenir el desarrollo de resistencia a la insulina, la disfunción de las células  $\beta$  y las complicaciones micro y macro vasculares de la diabetes, al incrementar la expresión de toda una maquinaria de enzimas antioxidantes en diferentes tipos celulares.

## **2.5. Factor de transcripción Nrf2 y diabetes**

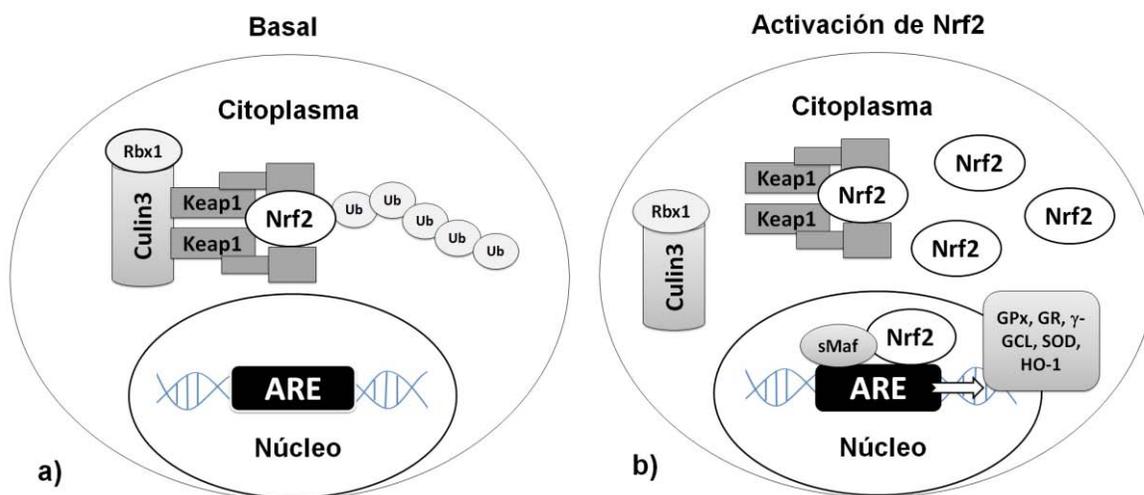
El factor Nrf2 se le conoce como el “regulador maestro de la defensa antioxidante endógena”, ya que es un regulador constitutivo e inducible de diversas enzimas citoprotectoras (Nguyen y col., 2003, Itoh y col., 2004, Surh y col., 2008). A partir de la caracterización de su activación y sus genes diana, la investigación sobre su participación en enfermedades que tienen en común el estrés oxidante comenzó a incrementar de manera potencial. Actualmente, varias investigaciones en animales y líneas celulares han fortalecido la hipótesis de su intervención en el desarrollo de diabetes y sus complicaciones. Sin embargo, hasta la fecha no hay informes en la literatura en los cuales se asocien los niveles de Nrf2 con la diabetes en humanos.

### **2.5.1. Activación de Nrf2**

Nrf2 es una proteína de 605 aminoácidos que tiene 7 dominios funcionales y pertenece a la familia de factores de transcripción bZip, con un motivo de cierre de leucinas en la región C-terminal.

En condiciones basales, Nrf2 permanece en el citoplasma anclado a la proteína 1 asociada al dominio tipo Kelch-ECH (Keap1 por sus siglas en inglés: Kelch-like ECH-associated protein 1), la cual también se une a la proteína Culina-3, formándose el complejo de ubiquitina ligasa E3 a través de la asociación con la proteína Ring-Box1 (Rbx1, también llamada Roc1). Este complejo permite marcar mediante moléculas de ubiquitina a Nrf2 y su consecuente degradación proteosómica (Figura 4a) (Sykiotis y Bohmann, 2008, Baird y Dinkova-Kostova, 2011).

Los compuestos electrófilos y las especies reactivas pueden modificar ciertos residuos de cisteína de la proteína Keap1, provocando un cambio de conformación del complejo Keap 1/Cul3/Rbx1, permitiendo que las moléculas libres de Nrf2 se transloquen al núcleo. Junto a pequeñas proteínas Maf (sMaf), Nrf2 en núcleo se une a una secuencia de nucleótidos en el promotor de las enzimas antioxidantes, denominada “elementos de respuesta antioxidante” (ARE, por sus siglas en inglés) incrementando así la expresión de genes citoprotectores (Figura 4b). Este sistema se expresa ubicuamente en una variedad de líneas celulares (Xu y col., 2006; Nguyen y col., 2009).



**Figura 4.** Sistema Nrf2-Keap1. En condiciones basales a) Nrf2 se encuentra secuestrado en el citoplasma por la proteína Culina3 (Culin3) y Rbx1 que mantienen el heterodímero junto con Keap1. Cuando ocurren cambios en el estado redox de la célula b) el complejo Cul3/Rbx1/Keap1-Nrf2 se desestabiliza permitiendo la translocación de Nrf2 al núcleo y su unión a las secuencias ARE de genes citoprotectores (Adaptado de Baird y Dinkova-Kostova, 2011).

Se ha sugerido, que algunos inductores específicos de Nrf2 podrían funcionar como buenos agentes protectores contra el estrés oxidante. Se han encontrado una gran cantidad de compuestos, tanto sintéticos como provenientes de la dieta, que activan de manera eficiente a Nrf2. Entre éstos se incluyen inductores naturales como el sulforafano que se encuentra en el brócoli, el 6-metilsulfinilhexilo, el éster fenético del ácido cafeico (CAPE, un componente fenólico del propóleo de la miel de abeja), el resveratrol y la curcumina que es el principio activo del polvo de cúrcuma (Kapiszewska, 2006; Aleksunes y col., 2010; Palsamy y Subramanian, 2011; He y col., 2012; Kumar y col., 2014). Su estudio como activadores de Nrf2 ha sido importante para entender su modulación y su participación en diferentes enfermedades, entre ellas el síndrome metabólico y la diabetes.

### **2.5.2. Participación de Nrf2 en la resistencia a la insulina**

La interacción de Nrf2 con la insulina es un tema emergente. Se sabe que la proteína cinasa B (PKB/Akt), que participa en la señalización de insulina, puede modular la función de Nrf2 (Geraldine y col., 2008; Chang y col., 2011). En modelos animales alimentados con dietas altas en grasa, la activación de Nrf2 disminuye el estrés oxidante y mejora la señalización de la insulina, al mismo tiempo que inhibe las condiciones de inflamación y de estrés reticular (Yu y col., 2011).

En modelos animales modificados genéticamente en un alelo de Keap1 y alimentados con una dieta hipercalórica, se redujeron los niveles de glucosa en comparación con los animales no modificados genéticamente. En estos animales también se encontró menor actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa y menor expresión de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa 1 en hígado, disminuyendo así la tasa de gluconeogénesis (Uruno y col., 2013).

En animales obesos carentes de leptina y Nrf2, los niveles de glucosa y la intolerancia a la misma incrementaron en comparación con aquellos que sólo eran carentes de leptina (Xue y col., 2007). Adicionalmente, en el hígado de animales carentes de Nrf2 se observó muerte celular y daño en la señalización de la insulina (Beyer y col., 2008). En contraste, se ha documentado que la inducción genética de Nrf2 puede incrementar la sensibilidad a insulina en comparación con los animales no modificados mediante una evaluación de la tolerancia a insulina (Uruno y col., 2013).

### **2.5.3. Participación de Nrf2 en la disfunción de las células $\beta$**

En ratones transgénicos que sobre expresan la sintasa de óxido nítrico inducible en páncreas, la inhibición genética de Nrf2, mostró mayor apoptosis de las células  $\beta$  del páncreas. En contraste, la inducción genética de Nrf2 suprimió el daño por estrés oxidante del DNA e incrementó la secreción de insulina de las células  $\beta$  del páncreas. Además, se observó un incremento de la inducción de genes relacionados con el metabolismo y la producción de glutatión lo que se asoció con menor tasa apoptosis mediada por óxido nítrico, demostrando así que el sistema Keap1-Nrf2 es crucial como vía de defensa ante condiciones patológicas en el páncreas (Yagishita y col., 2014).

En células de insulinoma de ratón (Min6), utilizando un inhibidor del factor nuclear kappa B, se observó activación de Nrf2 e incremento de la expresión de enzimas antioxidantes. Además, la activación de Nrf2 por *ter*-butil-hidroquinona, inhibió la muerte celular mediada por óxido nítrico (Ogasawara y col., 2013).

Finalmente, animales con diabetes inducida por estreptozotocina y sin el gen de Nrf2 presentan niveles más altos de glucosa y mayor tasa de gluconeogénesis (Aleksunes y col., 2010).

### **2.5.4. Nrf2 y complicaciones de la diabetes**

Debido a que la hiperglicemia crónica es causa de complicaciones secundarias, se ha observado que en animales modificados genéticamente deficientes de Nrf2 y con hiperglucemia inducida por estreptozotocina, desarrollan nefropatía diabética. (Yoh y col., 2008). En estudios con inductores electrofílicos de Nrf2, tal como sulforafano, la activación de Nrf2 puede evitar el desarrollo de nefropatía diabética.

La activación de Nrf2 también contribuye a prevenir la retinopatía diabética y la cardiomiopatía. En modelos animales de retinopatía diabética inducida por estreptozotocina, la disfunción de la barrera de la retina y la función neuronal se dañó severamente en ratones knockout de Nrf2 en comparación con los ratones no modificados genéticamente lo que sugiere que el sistema Keap1-Nrf2 ayuda a proteger contra la aparición y/o progresión de la diabetes retinopatía (Xu y col., 2014).

Hee y colaboradores (2009), observaron en cardiomiocitos primarios de ratones carentes genéticamente de Nrf2 mayor tasa de apoptosis, sugiriendo que Nrf2 es importante para la supervivencia celular. En líneas celulares endoteliales humanas

incubadas con glucosa (30 mmol/L), la activación de Nrf2 por medio de sulforafano previno la activación de la vía de las hexosaminas y PKC (Xue y col., 2008). En arterias mesentéricas de ratones diabéticos (db/db), la localización de Nrf2 en la fracción nuclear fue menor, sin embargo, tras su activación con sulforafano, se incrementó su actividad transcripcional y la expresión de la enzima gama glutamato cisteína ligasa, la cual es la principal enzima que cataliza la biosíntesis de glutatión (Velmurugan y col., 2013).

## **2.6. Estudio de polimorfismos de un sólo nucleótido**

A nivel genético, la diabetes es considerada una enfermedad compleja, debido a la interacción de múltiples genes y factores ambientales. Aunque, el estudio de la base genética de este tipo de enfermedades es muy complejo por la gran cantidad de genes involucrados y su interacción con el ambiente, existen estrategias diversas estrategias para su estudio.

Una de las estrategias más utilizadas es la detección de “genes candidatos” a partir de microarreglos de DNA, en donde se incluyen millones de variantes génicas y se estudia la relación existente entre la variabilidad del genoma y el fenotipo estudiado. Sin embargo, se requiere de equipo especializado de elevado costo y de expertos para su interpretación. Bajo este esquema se han descrito miles de variantes génicas en el genoma humano y que tienen una fuerte asociación con enfermedades complejas.

Otra estrategia es a partir de la aplicación genes candidatos que están directa o indirectamente relacionados con la patología. Estos genes se seleccionan de estudios previos en otras poblaciones. Debido a su abundancia, se utilizan frecuentemente los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés). Este tipo de variante se debe al cambio de una sola base en la secuencia del DNA y se encuentran en más del 1% de los cromosomas de una población (Gibson y Muse, 2004). Dependiendo de la zona del gen en que se dé la mutación, se puede inducir cambios en el patrón de expresión del gen o en la proteína.

Los SNPs tienen una forma común de nomenclatura y se expresan de acuerdo a un número de registro del SNP (prefijo “rs”) en la base del proyecto de haplotipos del genoma humano (HapMap).

En los estudios de genes candidatos la estrategia se basa en la selección de individuos casos y controles no relacionados genéticamente (no incluye familias) y se

compara la frecuencia relativa de los polimorfismos entre los individuos afectados y un grupo control adecuado. Si un alelo polimórfico es más frecuente en los individuos caso, podemos considerar que dicho alelo está asociado, directa o indirectamente a su manifestación (el rasgo de evaluación como una enfermedad) (Wang y col., 2011).

La búsqueda de polimorfismos en el campo de la diabetes se ha encaminado a interpretar la relación entre el polimorfismo de los genes y las señales para el control de la glucosa. Actualmente, diversos estudios de polimorfismos en individuos diabéticos incluyen polimorfismos de enzimas antioxidantes y pro oxidantes, ya que influyen en el balance redox de la célula durante la enfermedad.

### **2.6.1. Polimorfismo C242T (rs4673) de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa**

La enzima NADPH oxidasa se localiza en el citoplasma, por lo que su anclaje y activación en la membrana para la producción de superóxido depende de la proteína p22phox. La alteración en sus niveles de expresión o su estructura, afectan la actividad de la enzima y la producción de superóxido (Sumimoto y col., 2005).

El gen que codifica para la subunidad p22phox es el citocromo b-245, polipéptido alfa (CYBA, por sus siglas en inglés), el cual se localiza en el cromosoma 16q24 (Sumimoto y col., 2005; Bedard y Krause, 2007). Se conocen 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) con efectos conocidos en enfermedades complejas. Uno de los polimorfismos más estudiado es el que contiene un cambio de citocina a timina en la posición 242 del gen (C242T, rs4673). Este cambio de bases provoca un cambio en el codón CAC a TAC, lo que resulta en una sustitución del aminoácido histidina por tirosina. En diversos estudios se ha documentado que la presencia de tirosina puede alterar el sitio de unión al grupo hemo de la proteína y por tanto, menor actividad de la enzima (Moreno y Zalba, 2010).

La prevalencia del genotipo CC fue más alta en diabetes tipo 2 pero no en la 1 (Matsunaga y col., 2003, Sun y col., 2014). Por otro lado, Santos y col. (2005) encontraron que mayor frecuencia del alelo T se asociaba con una susceptibilidad a desarrollar nefropatía diabética secundaria a la diabetes mellitus tipo 2. Okano y col. (2003) describieron que los pacientes con diabetes tipo 2 con el genotipo TC y TT tenían significativamente menor lesión en la región media de la íntima, que aquellos con el genotipo CC. Nakano y col. (2003) y por otro lado Hayaishi-Okano y col. (2002)

encontraron asociación directa en este polimorfismo y la rápida oxidación de lipoproteínas en pacientes diabéticos.

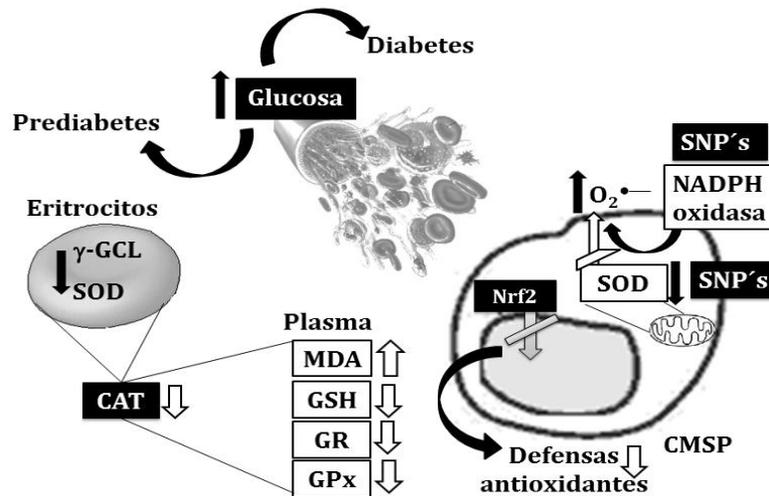
### **2.6.2 Polimorfismo Val16Ala (rs4880) de enzima superóxido dismutasa**

Esta enzima reduce el radical superóxido a  $H_2O_2$  y tiene 3 isoformas: la citoplasmática, dependiente de cobre y zinc (CuZn-SOD o SOD1), la isoforma que se encuentra matriz mitocondrial y es dependiente de manganeso (Mn-SOD o SOD2) y la isoforma extracelular dependiente de cobre y zinc (EC-SOD o SOD3). El gen *sod2* se localiza en cromosoma 6q25.3 del humano y en él se han identificado 9 polimorfismos con asociados a enfermedades que tienen en común el estrés oxidante. Uno de los polimorfismos más estudiado es el rs4880, en el cual se produce un cambio de citosina a timina en el exón 2, lo cual se traduce en un cambio del aminoácido valina por alanina en residuo 16 de la proteína.

La alta frecuencia de valina se asocia con una menor expresión del gen y se ha observado que el mRNA es inestable, lo que afecta el importe de superóxido dismutasa a la mitocondria (Sutton y col., 2005). Liu y col. (2009) encontraron en pacientes chinos con diabetes tipo 2 que este polimorfismo se asoció con el riesgo de padecer nefropatía diabética. Por otro lado, en pacientes ingleses diabéticos, Jones y col. (2010) observaron que el genotipo TT se asocia con un incremento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.

### **2.7. Integración**

Se ha mencionado que el estrés oxidante es una condición importante para el desarrollo de resistencia a insulina, disfunción  $\beta$ -pancreática y por tanto desarrollo de la diabetes. Además, es posible que el estrés oxidante se vea incrementado por factores genéticos y por una menor actividad del factor de transcripción Nrf2. Por tanto, esta investigación se dirigirá bajo el siguiente esquema (Figura 6).



**Figura 6. Integración del desbalance redox en los pacientes prediabéticos y diabéticos.** Las concentraciones de glucosa promueven el desarrollo de estrés oxidante, el cual puede ser detectado en eritrocitos y plasma por un incremento malondialdehído (MDA) y disminución de la enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), gama glutamato cisteína ligasa ( $\gamma$ -GCL), glutatión reductasa y glutatión peroxidasa (GPx), provoduciendo una caída en el antioxidante endógeno glutatión (GSH). Por su parte, en células mononucleares desangre periférica (CMSP), la actividad de Nrf2 puede ser defectuosa, constribuyendo a una caída en las defensas antioxidantes. Además, polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) puede ejercer un efecto incrementando la actividad de la enzima NADPH oxidasa y disminuyendo la actividad de la enzima SOD, de manera que se incremente la cantidad de radical superóxido, incrementando así el estrés oxidante en estos pacientes.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

México se encuentra entre los 10 países con mayor prevalencia de diabetes en el mundo. En las últimas 3 décadas, los cambios negativos en el estilo de vida y el ambiente, junto con los factores genéticos, han permitido que su incidencia incremente de forma alarmante.

Está bien establecido que el estrés oxidante juega un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad y en la progresión de complicaciones secundarias. Sin embargo, hasta hace poco, se ha reconocido el papel del factor de transcripción Nrf2 en el desarrollo de enfermedades que tienen en común el estrés oxidante, ya que es considerado el regulador maestro de la respuesta endógena antioxidante.

No obstante, hasta la fecha no existen publicaciones en las bases de datos de índole nacional ni internacional en donde se evalúe el papel de Nrf2 en la diabetes tipo 2 y/o sus complicaciones en humanos. Además, el evaluar al regulador endógeno maestro puede dar información más relevante que la implementación de un antioxidante endógeno.

Teniendo en cuenta que la dieta es uno de los principales factores involucrados en el desarrollo de diabetes y que el factor de transcripción Nrf2 es activado por fitoquímicos naturales, entonces se pueden establecer nuevas estrategias a nivel alimenticio y farmacológico para el tratamiento de esta enfermedad.

### **IV. HIPÓTESIS**

La presencia de estrés oxidante en los individuos diabéticos estará asociada a una menor actividad de Nrf2 en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes diabéticos.

Además, el desarrollo de estrés oxidante se asociará con polimorfismos en la enzima NADPH oxidasa y superóxido dismutasa.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Determinar los factores que contribuyen al desbalance redox en la diabetes tipo 2 en una muestra de población mexicana.

### **5.2. Objetivos particulares**

- a) Generar una base de datos mediante la selección de pacientes diabéticos, prediabéticos y controles de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión.
- b) Caracterización clínica de la población de estudio.
- c) Determinar el estado redox de la muestra poblacional por medio de la medición de la capacidad antioxidante total, marcadores de estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes en plasma y eritrocitos.
- d) Establecer si la modificación en los niveles de los marcadores redox se asocian con características clínicas o antropométricas.
- e) Cuantificar los niveles de Nrf2 en los núcleos de células mononucleares de sangre periférica de los individuos que comprenden la muestra poblacional.
- f) Determinar si los niveles de Nrf2 están asociados con los marcadores del estado redox.
- g) Determinar si polimorfismos en enzimas pro oxidantes y antioxidantes están asociados a la presencia de diabetes mellitus.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Diseño del estudio**

Esta investigación se llevó a cabo bajo un esquema de casos y controles en individuos mestizos mexicanos residentes del Distrito Federal. Se trató de un estudio multicéntrico y para el reclutamiento de los individuos, se contó con la participación de las siguientes instituciones:

- Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos (HRLALM) del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE).
- Cuatro clínicas de medicina familiar del ISSSTE de la zona sur del Distrito Federal: CMF Del Valle, CMF Fuentes Brotantes, CMF Ignacio Chávez y CMF Xochimilco
- La Clínica de Detección y Diagnóstico Automatizado (CLIDDA) del ISSSTE
- El Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga

Para participar en el estudio, se eligieron los sujetos que cumplieron los siguientes criterios de selección.

#### **a) Criterios de inclusión**

##### **Controles**

- Hombres o mujeres con edad de 35 a 77 años.
- Sin diagnóstico de cualquier tipo de diabetes.
- Glucemia en ayunas <100 mg/dL y hemoglobina glucosilada <5.7
- Valores de HOMA-IR  $\leq 2.5$ .

##### **Prediabéticos**

- Hombres o mujeres con edad de 35 a 77 años.
- Sin diagnóstico previo de cualquier tipo de diabetes.
- Glucemia en ayunas entre 100 y 125 mg/dL y hemoglobina glucosilada entre 6 y 6.4%.
- O glucosa post prandial de 2 horas entre 140-199 mg/dL tras una carga oral de glucosa de 75 g.
- Valores de HOMA-IR > 2.6.

## **Diabéticos**

- Hombres o mujeres con edad de 35 a 77 años.
- Con diagnóstico previo de diabetes tipo 2.
- O glucosa post-prandial de 2 horas >200 mg/dL tras una carga oral de glucosa de 75 g.

### **b) Criterios de exclusión**

- Pacientes con diabetes tipo 1, gestacional u otro tipo de diabetes.
- Pacientes con padres y abuelos no nacidos en México o que desconocieran estos antecedentes.

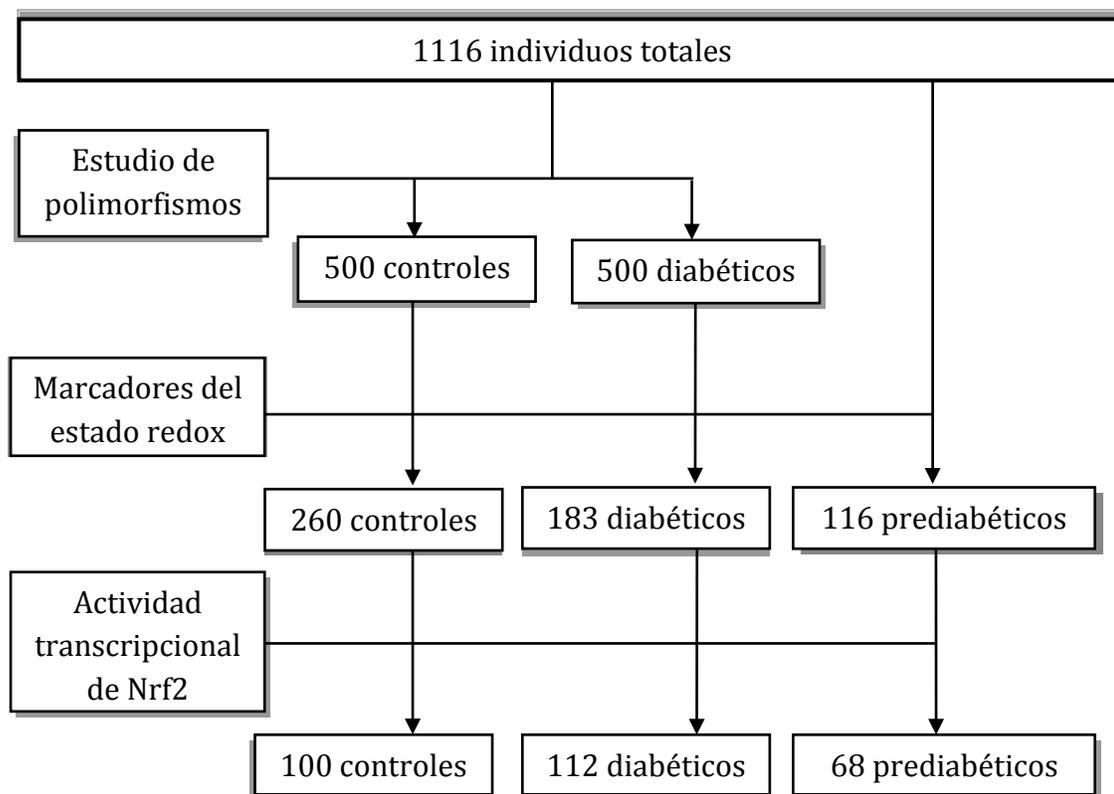
### **c) Criterios de eliminación**

- El no contar con historia clínica completa y/o resultados completos de laboratorio.
- Que no acepten participar en el estudio o no firmen el consentimiento.

Antes de iniciar el estudio a los pacientes se les solicitó la firma del consentimiento informado en las Instituciones Hospitalarias correspondientes (ANEXO 1), con previa aprobación del Comité de Ética del Hospital Regional 1º de Octubre ISSSTE (número de registro: 218.2013 para el estudio de polimorfismos y 254.2013 para el estudio de los marcadores de estrés y Nrf2). A cada individuo se le realizó una historia clínica con énfasis en antecedentes familiares de diabetes, se les midió la presión arterial, el peso y la talla.

## **6.2. Tamaño de la muestra**

Debido a que se incluyeron estudios de polimorfismos, la muestra poblacional total fue de 1116 individuos. Sin embargo, para la medición de los marcadores de estrés oxidante y la actividad transcripcional de Nrf2, se requirió procesar las muestras en fresco para evitar su oxidación. De esta manera, el tamaño de muestra para estos ensayos se ajustó como se muestra en el Diagrama 1.



**Diagrama 1.** Tamaño de la muestra en cada etapa

### 6.3. Obtención de las muestras sanguíneas

A los sujetos que consintieron en participar en el estudio se le realizó una toma de sangre por punción venosa con sistema vacutainer™, la cual se recolectó en un tubo rojo de 6 ml para la obtención de suero para la química sanguínea. Para los ensayos restantes, se utilizó sangre total recolectada en tres tubos lilas vacutainer™, cada uno con 6 ml de capacidad y 1 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante. La sangre total se destinó para la obtención de plasma, eritrocitos, células mononucleares de sangre periférica y DNA.

### 6.4. Determinaciones clínicas

El suero se obtuvo centrifugando la sangre a 3000 x g durante 15 minutos y se utilizó para la determinación de glucosa, insulina, colesterol total, colesterol de alta densidad (HDL), colesterol de baja densidad (LDL), triglicéridos, creatinina, urea y ácido úrico. Para la hemoglobina glucosilada, se tomaron 10 µl de sangre total. Estas

determinaciones se realizaron en los laboratorios centrales de cada institución en donde se reclutaron los individuos y se llevaron a cabo el mismo día de la toma de sangre, en equipo automatizado.

### **6.5. Marcadores del estado redox**

Se utilizaron 6 ml de sangre total para la obtención de plasma y eritrocitos, la cual se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a 4° C. Se separó el plasma con micro pipeta, se colocó en un tubo estéril de 2 ml y se almacenó a -40° C. Los eritrocitos remanentes se lavaron con dos volúmenes de solución salina y se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos a 4° C. Posteriormente, se eliminó la fracción acuosa y se les agregaron 4 volúmenes de agua para lisarlos. Se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos a 4° C y se utilizó el sobrenadante, el cual se almacenaron a -20° C.

Las determinaciones de los marcadores de estrés, que se enlistan a continuación, se realizaron dentro de las 48 horas posteriores a la obtención de la muestra, para evitar la oxidación a causa del almacenamiento.

- a) Capacidad antioxidante en plasma y eritrocitos. Se determinó al evaluar la capacidad de reducir el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
- b) Marcadores de estrés en plasma. Se cuantificaron las concentraciones de malondialdehído y glutatión total, el cual comprende la cuantificación de glutatión reducido y glutatión disulfuro.
- c) Actividad de enzimas antioxidantes. En plasma, se determinó la actividad enzimática de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. En eritrocitos lisados, la actividad de superóxido dismutasa y gama-glutamato cisteína ligasa.

Se utilizó espectrofluorofotometría para la medir la actividad enzimática de gamma-glutamato cisteína ligasa, mientras que las determinaciones restantes se realizaron por medio de ensayos espectrofotométricos. Cada ensayo se realizó por duplicado y se llevó acabo utilizando un lector de placas multimodal Synergy HT (Biotek, Winooski, VA, USA), bajo la siguientes metodologías.

#### ***a) Capacidad antioxidante total por el método de DPPH***

Este método provee una evaluación del estado antioxidante total debido a que determina la capacidad que tiene la muestra problema de reducir el radical DPPH. Éste al estar en disolución forma un radical con una coloración púrpura y al ser

reducido a difenilpicril hidracina, torna a color amarillo, el cual puede ser detectado espectrofotométricamente a 517 nm.

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Koren y col. (2010), bajo las siguientes especificaciones. En cada tubo de reacción se colocaron 50  $\mu$ L de solución salina 0.9% y se añadieron 25  $\mu$ L de plasma concentrado o 50  $\mu$ L de eritrocitos diluidos 1:2 con agua. Como control positivo de la formación del radical, se utilizaron 75  $\mu$ L de solución salina 0.9%. La reacción se inició al agregar 50  $\mu$ L del radical DPPH (stock 2mM en etanol) a la muestra y al control positivo, y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 800  $\mu$ L de etanol absoluto, seguido de agitación y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Pasado el tiempo, los tubos se centrifugaron a 1,500 x g por 2 minutos y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 517 nm.

Tomando en cuenta que el control positivo equivale al 100% de generación del radical DPPH, la capacidad antioxidante se expresó como la diferencia porcentual de la densidad óptica de cada muestra respecto al control positivo.

#### ***b) Malondialdehído***

El malondialdehído de la muestra es capaz de reaccionar con el 1-metil-2-fenilindol, que en condiciones ácidas, produce un cromóforo de alto coeficiente de extinción molar con un máximo de absorción de longitud de onda de 586 nm. Esta reacción es específica en presencia de ácido clorhídrico.

La metodología se realizó bajo las modificaciones descritas previamente por nuestro grupo (Gaona-Gaona y col., 2011). Se mezclaron 200  $\mu$ L de plasma con 650  $\mu$ L de una solución 10 mM de 1-metil-2-fenilindol (en acetonitrilo/metanol 3:1). La reacción se inició al añadir 150  $\mu$ L de ácido clorhídrico al 37%. Posteriormente, las muestras se incubaron a 45°C por 40 min y se centrifugaron a 15000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia del sobrenadante de cada muestra a 586 nm. La concentración de malodialdehído se expresó en  $\mu$ M y se calculó mediante una curva de calibración con un análogo sintético de malondialdehído, el tetrametoxipropano, utilizando 6 estándares con concentraciones de 0.74 a 24  $\mu$ M.

### **c) Glutación total**

El ensayo se basa en la reacción de glutación con el ácido ditionitrobenzoico (DTNB; también conocido como reactivo de Ellman), produciendo un aducto entre el glutación disulfuro y el ácido tionitrobenzoico (GS-TNB), el cual tiene máxima absorbancia a 412 nm. La velocidad de formación de TNB es proporcional a la concentración de glutación en la muestra. El producto GS-TNB es reducido entonces a glutación por la enzima glutación reductasa en presencia de NADPH. Ya que la enzima glutación reductasa reduce el glutación disulfuro en 2 moléculas de glutación, la concentración final de glutación total es:

$$[\text{Glutación}] \text{ total} = [\text{glutación reducido}] + 2[\text{glutación disulfuro}]$$

La velocidad de cambio de la absorbancia ( $\Delta A_{412\text{nm}}/\text{min}^{-1}$ ) es lineal y proporcional a la concentración total de glutación (Rahman y col. 2006).

El plasma de los sujetos se trató inmediatamente con medio volumen de ácido sulfosalicílico al 0.6% para precipitar las proteínas de la muestra. Enseguida se centrifugó a 8000 x g durante 10 minutos a 4°C y se utilizó el sobrenadante para los ensayos de glutación total y disulfuro.

- **Glutación total.** La reacción se hizo en microplaca de 96 pozos, en los cuales se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar de glutación (concentraciones de 0.103 a 26.4 mM). La mezcla de reacción inicial consistió en una solución de DTNB (1.68 mM) en buffer de fosfatos 0.1 M con EDTA 5mM (buffer KPE) y 10 unidades de glutación reductasa. Se inició la reacción al agregar 120  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y se agitó la placa 30 segundos, para permitir la reducción del glutación disulfuro a glutación reducido. Posteriormente, se agregaron 60  $\mu\text{L}$  de NADPH (0.8 mM en buffer KPE) y leyó la absorbancia a 412 nm, tomando cada minuto la lectura durante 2 minutos (3 lecturas de 0, 60 y 120 segundos). Se calculó el cambio de absorbancia por minuto y se determinó la concentración de glutación total interpolando en la curva estándar de calibración.
- **Glutación disulfuro.** Para esta determinación, se utilizó 100  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar de glutación disulfuro (concentraciones de 0.103 a 26.4 mM) y se trató con 2  $\mu\text{L}$  de 2-vinilpiridina (diluida 1:10 con buffer KPE) para derivatizar la reacción incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 6  $\mu\text{L}$  de trietanolamina (diluida 1:6 con KPE), se mezcló vigorosamente y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente para neutralizar la reacción. Posteriormente, se procedió de la misma manera que para la determinación de glutación total. Los

niveles de glutatión disulfuro fueron necesarios para determinar la concentración de glutatión reducido en la muestra en donde:

$$[\text{glutatión reducido}] = [\text{glutatión total}] - 2[\text{glutatión disulfuro}]$$

#### ***d) Actividad enzimática de Glutatión Peroxidasa***

La actividad de esta enzima se determinó de manera indirecta por una reacción acoplada con la enzima glutatión reductasa, lo que causa la disminución de la absorbancia a 340 nm debido al consumo de NADPH. La enzima glutatión peroxidasa al reducir los hidroperóxidos consume glutatión, el cual es regenerado a partir de glutatión disulfuro por la acción enzimática de glutatión reductasa, proceso que consume NADPH (Gaona-Gaona y col., 2011).

Se utilizó plasma diluido 1:2 con solución salina 0.9%. Se colocaron 35  $\mu\text{L}$  de muestra o solución salina 0.9% (blanco) en cada pozo de la microplaca de 96 pozos y se añadieron 270  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción compuesta de: EDTA (1mM), ácida de sodio (1 mM), NADPH (0.2 mM), glutatión reducido (1mM) y glutatión reductasa (1 U/ml), en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4. Se incubó la placa durante 5 min y se agregaron 35  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.625 mM). Inmediatamente, se leyó la absorbancia a 340 nm cada minuto, durante 3 minutos, a 340 nm. Los resultados se expresaron como unidades de glutatión peroxidasa que oxidan 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por mL de plasma.

#### ***e) Actividad de glutatión reductasa***

La actividad enzimática de glutatión disulfuro se evaluó por la reducción de NADPH a 340 nm cuando a la muestra se le añade glutatión disulfuro y NADPH (Gaona-Gaona y col., 2011).

Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de plasma diluido 1:2 con solución salina 0.9% en cada pozo de la microplaca. Se agregaron 340  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que contenía glutatión disulfuro (1.25 mM), EDTA (0.5 mM) y NADPH (0.1mM) en amortiguador de fosfatos 10mM pH 7.6. Inmediatamente, se leyó la absorbancia a 340 nm cada minuto, durante 3 minutos, a 340 nm.

#### ***f) Actividad de superóxido dismutasa***

Para determinar la actividad de esta enzima, se utilizó el sistema xantina-xantina oxidasa para la generación del radical superóxido y azul de nitrotetrazolio como reactivo indicador. Éste es reducido a formazán el cual se mide a 586 nm.

Primeramente se determinó que el sistema generara anión superóxido. Se colocaron 66  $\mu\text{L}$  de agua en diferentes tubos y se agregaron 332  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción compuesta de xantina (0.122 mM), EDTA (0.122 mM), azul de nitrotetrazolio (30.6  $\mu\text{M}$ ) y carbonato de sodio (49 mM). Para determinar la cantidad de enzima necesaria, ya que es muy inestable a temperatura ambiente, se utilizó una solución de xantina oxidasa 0.168 U/mL en sulfato de amonio 2 M. Se probaron diferentes volúmenes (10 a 20  $\mu\text{L}$ ) de solución de xantina oxidasa recién preparada, los cuales se agregaron a cada tubo de reacción y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se detuvo con 132  $\mu\text{L}$  de cloruro de cobre 0.8 mM y se determinó la densidad óptica a 586 nm. El tubo de reacción con la cantidad de enzima necesaria para producir una densidad óptica de 0.2 fue el que se utilizó para el ensayo.

Para las muestras, se colocaron 60  $\mu\text{L}$  de eritrocitos lisados diluidos 1:200 en solución salina 0.9%, se agregaron 332  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y el volumen necesario de enzima. La reacción se detuvo con 132  $\mu\text{L}$  de cloruro de cobre 0.8 mM y se determinó la densidad óptica a 586 nm. Una unidad de superóxido dismutasa se definió como la cantidad de enzima que inhibe al 50% la reducción de azul de nitrotetrazolio. Los valores se expresaron con U/mg de proteína.

#### ***g) Actividad de gamma glutamato cisteína ligasa***

Este ensayo se basa en que el compuesto 2,3-naftalendicarboxialdehído (NDA) forma aductos con el producto de la enzima (glutamato-cisteína). El NDA es un compuesto no fluorescente pero forma aductos fluorescentes con el glutatión y con el compuesto glutamato-cisteína. Se mide la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

Este ensayo se realizó con la metodología descrita por nuestro grupo (Guerrero-Beltrán y col., 2010), en eritrocitos lisados diluidos 1:2 en agua. Se utilizó una mezcla de reacción constituida de tris(hidroximetil) aminometano (400mM), adenosín trifosfato (40mM), L-ácido glutámico de sodio (20mM), EDTA (2mM), borato de sodio (20 mM), serina (2mM) y cloruro de magnesio (40 mM), la cual se incubó a 37° C por 15 min antes de añadirla a la muestra. Se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra en un micro tubo y se añadieron 12.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción, incubando a 37° C durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 12.5  $\mu\text{L}$  de cisteína 2 mM disuelta en amortiguador TES/SB (Tris 20mM, EDTA 1mM, sacarosa 250mM, borato de sodio 20mM y serina 2mM) y se incubaron a 37° C durante 10 min. La reacción se detuvo añadiendo 12.5  $\mu\text{L}$

de ácido sulfosalicílico (200 mM) e incubándolos a 4°C por 15 min. Los tubos se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min a 4° C. Para determinar la cantidad de glutamato-cisteína generado, se preparó una reacción basal para cada muestra, en donde se realizó el mismo procedimiento anterior sin agregar cisteína.

Se utilizó una placa de 96 pozos negra para fluorescencia, en donde se colocaron 20 µL del sobrenadante de cada muestra y se agregaron 155 µL de la solución de NDA (Tris 50mM pH 10, NaOH 0.5N y NDA 10mM en dimetil sulfato, en relación v/v/v: 1.4/0.2/0.2). Se protegió de la luz y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se determinó la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm. Se utilizó una curva de glutatión (concentraciones de 1nM a 1 µM) y por medio de regresión lineal e interpolación en la curva, se cuantificó la cantidad de glutamato-cisteína-NDA formada. Los resultados se expresan como nmol de glutatión por minuto por mg de proteína.

## **6.6. Determinación de Nrf2**

### **6.6.1. Extracción de células mononucleares y fracciones nucleares**

La extracción de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se realizó a partir de 6 ml de sangre total/EDTA, utilizando un gradiente de densidad comercial Lymphoprep® (Axis-Shield, Oslo, Norway). Inmediatamente, se aislaron las fracciones nucleares utilizando un estuche comercial de extracción de núcleos (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). Las fracciones se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

### **6.6.2. Ensayo de la actividad transcripcional de Nrf2**

Las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando el colorante de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Se utilizaron 20 µg de proteína nuclear para la determinación de Nrf2.

El ensayo de la actividad transcripcional o de unión de Nrf2 se realizó por medio de un kit comercial (TransAm Nrf2, Active-Motif, CA, EUA) tipo ELISA, el cual contiene inmovilizado en cada pozo las secuencias consenso de unión ARE (5'GTCACAGTGA CT CAGCAGAATCTG-3'). La forma activa de Nrf2 que se encuentra en la fracción nuclear se une específicamente a estos oligonucleótidos. Se utilizó un anticuerpo primario para detectar Nrf2, el cual reconoce un epítipo en la proteína cuando está unida a las secuencias ARE. Finalmente, la adición de un segundo

anticuerpo (peroxidasa de rábano conjugada-HRP), provee una coloración detectable a 450 nm, proporcional a la cantidad de Nrf2 unida a las secuencias ARE y por tanto, transcripcionalmente activa. Como control positivo del ensayo se utilizaron células COS-7, transfectadas con Nrf2.

### **6.7. Extracción del DNA y genotipificación**

La extracción de DNA se realizó por medio del protocolo descrito por Lahiri y Numberger (1991), el cual utiliza sales no caotrópicas para la extracción de DNA a partir de 6 ml de sangre total con 1 mg de EDTA.

Se determinó la concentración de DNA de cada muestra utilizando una placa de micro volúmenes (Take 3, Biotek) acoplada a un lector de absorbancia uv-visible (Epoch™, Biotek) a partir de 2 µL de muestra. Se realizaron alícuotas de 8 a 14 ng/µL de DNA para la genotipificación.

La detección de polimorfismos se realizó en el laboratorio de la Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano; en el Departamento de Investigación del HRLALM y en el laboratorio de Genómica, bajo la dirección del Dr. Gilberto Vargas Alarcón, en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

La genotipificación se realizó utilizando la reacción de oligohibridación alelo específica con sondas Taqman®, para determinar las variantes genéticas de la subunidad p22 phox de la enzima NOX (rs4673) y de la enzima SOD (rs4880).

La técnica de PCR-Tiempo Real se realizó en un equipo 7500 marca Applied Biosystems y con el sistema TaqMan® Universal Master Mix. El volumen de reacción comprendió 10 µL que contiene 5 µl de master mix, 0.125 µL de sonda, 4 µL de DNA (concentración de 8-14 ng/µL) y 0.875 µL de agua. Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron las siguientes: temperatura inicial de 50° C por 2 min, seguido de 95 °C por 10 min y 40 ciclos de: 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min.

### **6.8. Análisis estadístico.**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATA 12 (StataCorp, College Station, TX, EUA). Se determinó la distribución de Gauss por medio de la prueba de Shapiro - Wilk.

**a) Variables con distribución gaussiana**

Las comparaciones entre grupos se realizaron por medio de un análisis de varianza seguidos de un análisis post hoc (Bonferroni). Los resultados se expresan en tablas como la media  $\pm$  desviación y en las figuras como la media  $\pm$  error estándar.

**b) Variables con distribución no gaussiana**

Se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal - Wallis y los valores se describen como la media (rango intercuartílico, con presentación de 1er y 3er cuartil). Se realizaron análisis de regresión múltiple para estimar la relación entre los marcadores redox o actividad Nrf2 y los parámetros clínicos o antropométricos. Los gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism v. 6.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, EUA).

Para los resultados de la genotipificación, se utilizó una prueba Chi-cuadrada para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg en los individuos controles. Para el análisis de asociación entre los rasgos cuantitativos y los polimorfismos, se utilizarán modelos multivariados ajustando por sexo, edad, índice de masa corporal (IMC), estado de fumador, nivel de actividad física y otros potenciales confusores.

Según se requirió, las variables se normalizaron a través de una transformación logarítmica. La significancia estadística se consideró con una  $p < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Características de la población de estudio

#### 7.1.1. Características clínicas y antropométricas

Para la determinación del estado redox se incluyó un total de 559 sujetos, 260 sujetos control, 116 prediabéticos y 183 sujetos con diabetes tipo 2. Las características de los valores clínicos y antropométricos de cada grupo de estudio se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Características clínicas y antropométricas de los sujetos control (CTRL), prediabéticos (PRE) y diabéticos (DM2).

Variables	CTRL <i>n</i> = 260	PRE <i>n</i> = 116	DM2 <i>n</i> = 183	<i>P</i>
Edad (años)	48 (41–52)	45(43–54)	58.87 (50–64) <sup>a,b</sup>	<0.001
Masculino, <i>n</i> (%)	127 (48)	47 (18)	87 (34)	0.4360
Femenino, <i>n</i> (%)	138 (45)	69 (23)	96 (32)	-
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.7 (25–30)	31.4 (27.5–34.4) <sup>a</sup>	29 (26–31.4) <sup>a,b</sup>	<0.001
PAS (mmHg)	114 (110–120)	117 (110–120)	120.6 (110–130) <sup>a</sup>	<0.001
PAD (mmHg)	74.6 (70–80)	78 (70–80) <sup>a</sup>	77.5 (70–81) <sup>a</sup>	<0.001
Tabaquismo, <i>n</i> (%)	61 (24)	29 (25)	35 (19)	0.4050
Glucosa (mg/dL)	91 (86–97)	107 (99–113) <sup>a</sup>	154 (108–169) <sup>a,b</sup>	<0.001
HbA1c (%)	4.6 (4.2–5.1)	5.9 (5.7–6.1) <sup>a</sup>	7.4 (5.8–8.4) <sup>a,b</sup>	<0.001
HOMA-IR	1.8 (1.3–2.3)	4.8 (3.2–6) <sup>a</sup>	-	<0.001
T-G (mg/dL)	168 (106–210)	202 (130–242) <sup>a</sup>	214 (126–244) <sup>a</sup>	0.0059
C-T (mg/dL)	194 (167–217)	195 (168.5–218.5)	185 (150–212)	0.0910
HDL-C (mg/dL)	51 (43–58)	46 (39–53) <sup>a</sup>	44 (35–55) <sup>a</sup>	<0.001
LDL-C (mg/dL)	113 (94.5–132.5)	110 (90–130)	110 (84–129.5)	0.8800

Los datos se presentan como la media (rango intercuartílico). IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, HOMA-IR: modelo de evaluación de la homeostasis de la resistencia a la insulina, HbA1c: hemoglobina glucosilada, T-G: triglicéridos, C-T: colesterol total, HDL-C: colesterol de alta densidad, LDL-C: colesterol de baja densidad. Significancia estadística:  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs CTRL y <sup>b</sup> vs PRE.

Se puede observar que desde el estado prediabético existe un perfil lipídico adverso y la presencia de resistencia a la insulina medida por medio del modelo de evaluación de HOMA-IR. Además, es el grupo con la media del IMC en el rango de obesidad

En el grupo de diabetes tipo 2 se encontraron diferencias significativas con la edad, IMC, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, glucosa, hemoglobina glucosilada, triglicéridos y colesterol HDL. Por lo tanto, estos parámetros se incluyeron en el análisis multivariado como potenciales factores de confusión en la respuesta redox.

En términos de sobrepeso, la muestra poblacional es representativa de México. De hecho, la media del IMC se encuentra en rangos de obesidad en los sujetos prediabéticos y es menor en el grupo diabético (31 vs 29 kg/m<sup>2</sup>). La presión arterial sistólica y diastólica se altera en los pacientes diabéticos, con un incremento de la media de entre 5 y 3.2 %, respectivamente.

Para hacer una mejor distribución de los individuos en los grupos se determinaron los niveles de glucosa en ayunas y hemoglobina glucosilada de acuerdo a los criterios establecidos por la ADA (2014). Se encontró mayor variabilidad en el grupo de diabéticos, lo que refleja el descontrol de la enfermedad.

En cuanto al perfil lipídico, los niveles de triglicéridos aumentan durante el estado de prediabético y son más altos en la diabetes. De estos sujetos prediabéticos y diabéticos, 27% y 23%, respectivamente, informaron estar bajo tratamiento con fibratos principalmente. El colesterol HDL fue menor en los sujetos prediabéticos y diabéticos, en comparación con el grupo control (10% y 14% vs controles), no se observaron cambios significativos en el colesterol total y el colesterol LDL.

### **7.1.2. Características de los individuos diabéticos.**

Tanto el control de la glucosa, así como el tiempo de evolución de la enfermedad, pueden tener un efecto en la regulación del estado redox, ya que el fármaco de elección depende del tiempo de evolución de la enfermedad.

Los individuos diabéticos incluidos en el estudio se encontraban bajo tratamiento médico, debido a que se reclutaron en las clínicas de atención al paciente diabético. El 75% de los pacientes refirieron estar bajo tratamiento con biguanidas (metformina), sulfonilureas (glibenclamida), insulina o su combinación. El 14% de los diabéticos no recordaron el fármaco y el 11% refirieron no apegarse al mismo. En la

Tabla 4 se muestran los niveles de glucosa, la hemoglobina glucosilada y el tiempo de evolución de acuerdo al fármaco referido.

**Tabla 4.** Niveles de glucosa y hemoglobina glucosilada de acuerdo al tratamiento antidiabético referido por los sujetos diabéticos.

Fármaco	n	Frecuencia	Glucosa (mg/dL)	HbA1c (%)	Evolución
Biguanidas	34	0.18	145 (108-147)	6.5 (5.7-7.4)	6 (3-9)
Sulfonilureas	5	0.3	148 (100-139)	5.9 (5.1-6.8)	11 (8-14)
Insulina	24	0.13	166 (125-231)	7.6 (6-9.2)	13 (5-20) <sup>a</sup>
Biguanida-insulina	48	0.26	146 (99-167)	8.3 (7-9.7) <sup>a,b</sup>	11 (5-16)
Biguanida-sulfonilurea	27	0.15	186 (124-237)	8 (5.8-9.2) <sup>a</sup>	11 (6-13)
No recuerda	26	0.14	142 (95-167)	7 (5.6-8)	8 (4-13)
No se apega al tratamiento	21	0.11	140 (108-148)	6.4 (5.7-7.1)	5 (1-8)

Los datos de glucosa y hemoglobina glucosilada (HbA1c) se presentan como la media (rango intercuartílico). Evolución se refiere al tiempo de evolución en años. Significancia estadística  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs Biguanidas y <sup>b</sup> vs no se apega al tratamiento.

No se observó diferencia significativa entre las concentraciones de glucosa en ayunas, empero, los niveles de hemoglobina glucosilada se observaron más altos en aquellos pacientes que refieren el uso de la combinación de biguanidas con insulina o sulfonilureas, en comparación con los que se tratan sólo con biguanidas. Además, aquellos que utilizan sólo biguanidas, tienen menor tiempo de evolución de la enfermedad que aquellos que utilizan insulina.

Existe la limitación de que muchos pacientes refieren estar bajo tratamiento sin que realmente se apeguen a él. Para evitar sesgo estadístico por este factor, la medición de la hemoglobina glucosilada resulta una herramienta importante, ya que provee una medida de los valores crónicos de la glucosa. Por tanto, el grupo de diabéticos se dividió en dos grupos de acuerdo a los niveles de hemoglobina glucosilada, según lo recomendado por la ADA (2014):

- DM2-NC se refiere a los pacientes diabéticos con niveles de hemoglobina glucosilada  $\geq 7\%$  asociados a un pobre control glicémico
- DM2-C se refiere a los pacientes diabéticos con niveles de hemoglobina glucosilada  $< 7\%$ , lo que se asocia con un mejor control de la hiperglucemia.

Por tanto, estas características y aquellas significativas de los pacientes diabéticos se muestran en la Tabla 5 y en el ANEXO 2, se reportan las características totales determinadas en los pacientes.

Los niveles de glucosa en ayunas se observaron 25% más altos en promedio en los pacientes que tienen un control deficiente de la enfermedad. Así mismo, estos pacientes refirieron tener más eventos de hospitalización por hipoglucemia (50% más que los sujetos con HbA1c <7%). En cambio, no se observó diferencia significativa en el tiempo de evolución de la enfermedad y en el tratamiento (referido como variable dicotómica: con o sin tratamiento farmacológico).

**Tabla 5.** Características de los pacientes diabéticos de acuerdo a los niveles de hemoglobina glucosilada

Característica	DM2-NC HbA1c ≥ 7%	DM2-C HbA1c < 7%	<i>P</i>
Glucosa (mg/dL)	175 (125-226)	130 (98-141.5)	<0.001
HbA1c (%)	9 (7.4-9.9)	5.8 (5.5-6.2)	<0.001
Tiempo de evolución (años)	9.6 (5-14)	9.8 (5-15)	0.840
Tratamiento, n (%)	81 (93)	83 (84)	0.072
Hospitalización por hipoglucemia n (%)*	23 (26.4)	13 (13.3)	0.024

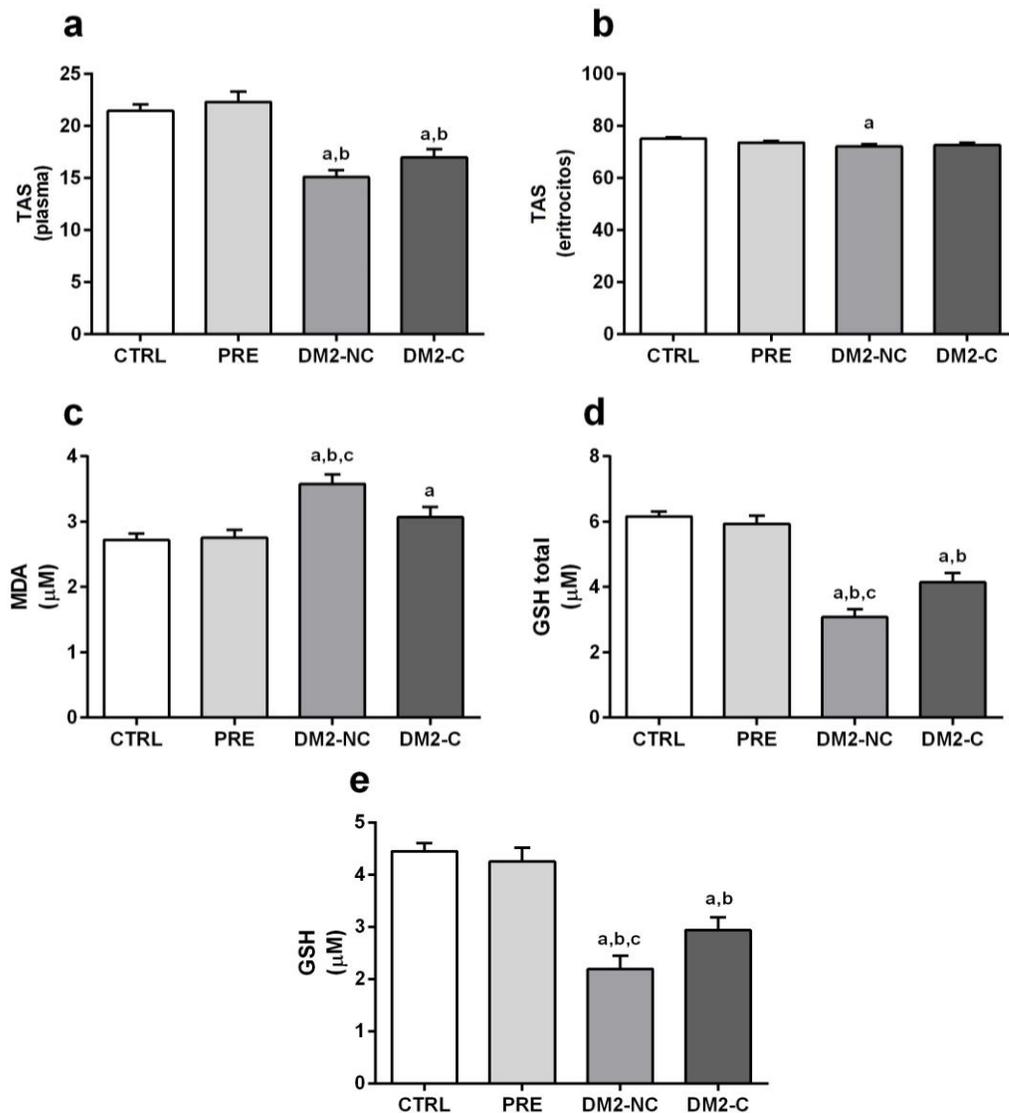
Los datos se presentan como la media (rango intercuartílico), para las variables continuas y en las variables dicotómicas la cantidad de individuos positivos “n” (porcentaje). HbA1c: hemoglobina glucosilada. \* Indica al menos un evento de hospitalización por hipoglucemia.

## 7.2. Estado redox

### 7.2.1. Capacidad antioxidante y marcadores de estrés

El estado antioxidante total, se determinó en el plasma y en los eritrocitos por el método de DPPH (Figura 6 a, b). En los sujetos prediabéticos no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, en los pacientes diabéticos con un pobre control glucémico, la capacidad antioxidante disminuyó tanto en plasma como en eritrocitos ( $15 \pm 6\%$  y  $5 \pm 0.8\%$ ,  $p < 0.001$  en comparación con el grupo control).

Para explicar el efecto de diversas variables en la capacidad antioxidante, en los sujetos diabéticos, se realizó un modelo de regresión lineal múltiple. Se encontró que la capacidad antioxidante total se asoció negativamente con la edad, el género y la hemoglobina glucosilada en el plasma y en eritrocitos sólo con la edad y la hemoglobina glucosilada (Tabla 6).



**Figura 6. Capacidad antioxidante y marcadores de estrés.** (a) estado antioxidante total (CAT) expresado en % de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en plasma y (b) en eritrocitos; (c) concentración de malondialdehído (MDA) en plasma; (d) concentración total de glutatión (GSH total) y (e) concentración de glutatión (GSH) en plasma. CTRL: Control, PRE: prediabetes, DM2-NC: sujetos diabéticos con pobre control glucémico (hemoglobina glucosilada  $\geq 7\%$ ), DM2-C: sujetos diabéticos en control glucémico (hemoglobina glucosilada  $<7\%$ ). Cada barra representa la media  $\pm$  S.E. Significancia estadística de  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs CTRL, <sup>b</sup> vs PRE y <sup>c</sup> vs DM2-C.

Por otra parte, las concentraciones de malondialdehído fueron mayores en el grupo de diabéticos con hemoglobina glucosilada  $\geq 7\%$  en comparación con el grupo control ( $p < 0.001$ ) y el grupo con hemoglobina glucosilada  $<7\%$  ( $p = 0.032$ ) (Figura 6c). De hecho, la regresión múltiple reveló que las concentraciones de

malondialdehído están asociadas con los niveles de hemoglobina glucosilada y el IMC (Tabla 6).

Las concentraciones de glutatión total (glutatión reducido y glutatión disulfuro), fueron menores en sujetos con diabetes (Figura 6d). Sin embargo, el grupo de sujetos diabéticos con hemoglobina glucosilada <7% tenían concentraciones más altas de glutatión total y de glutatión reducido en comparación con el grupo de diabéticos con hemoglobina glucosilada ≥7% (Figura 6e). Las concentraciones de glutatión se asociaron negativamente con la edad y la hemoglobina glucosilada (Tabla 6). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de glutatión disulfuro y la relación glutatión/glutatión disulfuro.

**Tabla 6.** Asociaciones de marcadores del estado redox y actividades antioxidantes con la edad, el sexo, el IMC, glucosa y la hemoglobina glucosilada en pacientes diabéticos.

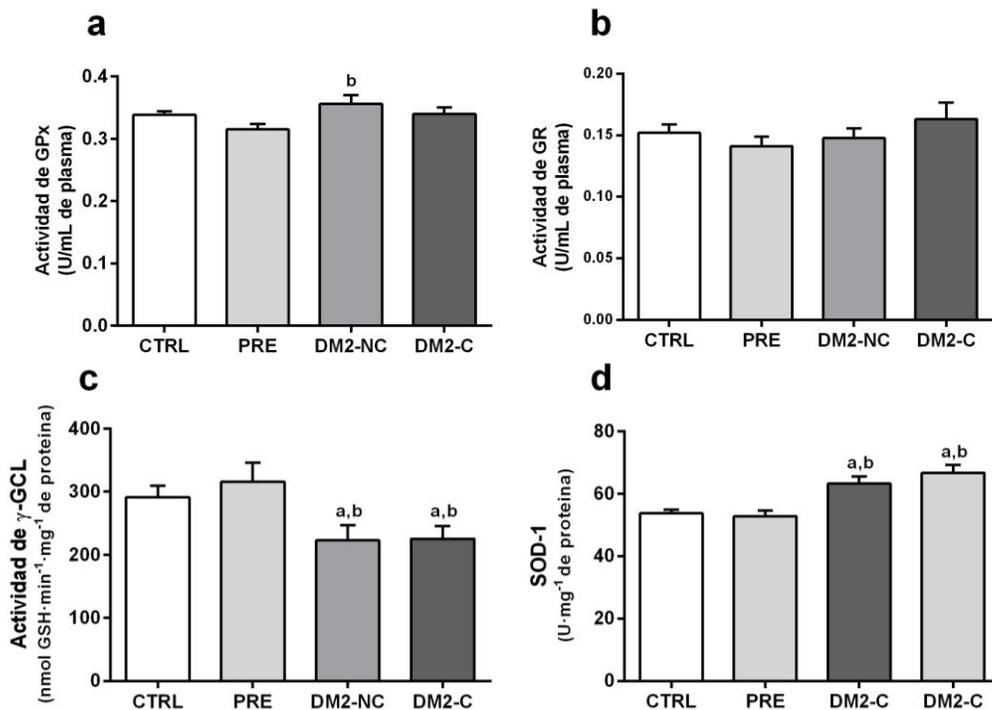
Variables		Edad	Género	IMC	Glucosa	HbA1c
CAT Plasma	$\beta$	-0.21	-2.28	0.01	-0.02	-0.98
	95% CI	-0.28 a -0.13	-3.82 a -0.19	-0.16 a 0.18	-0.04 a 0.08	-1.7 a -0.2
	<i>p</i>	<0.001	0.004	0.894	0.511	0.014
	$R^2$	0.19	-	-	-	-
CAT Eritrocitos	$\beta$	-0.26	-1.59	0.09	-0.012	-1.2
	95% CI	-0.36 a -0.17	-3.4 a 0.2	-0.11 a 0.3	-0.015 a 0.04	-1.95 a -0.44
	<i>p</i>	<0.001	0.084	0.411	0.381	0.002
	$R^2$	0.22	-	-	-	-
MDA	$\beta$	0.006	-0.14	0.04	-0.02	0.17
	95% CI	-0.01 a 0.23	-0.43 a 0.15	0.004 a 0.074	-0.004 a 0.003	0.06 a 0.28
	<i>p</i>	0.45	0.34	0.026	0.94	0.003
	$R^2$	0.08	-	-	-	-
GSH	$\beta$	-0.07	-0.46	0.04	0.002	-0.25
	95% CI	-0.1 a -0.04	-1.01 a 0.08	-0.02 a 0.11	-0.0007 a 0.004	-0.45 a -0.055
	<i>p</i>	<0.001	0.097	0.19	0.159	0.013
	$R^2$	0.13	-	-	-	-
SOD	$\beta$	0.29	7.04	0.052	-0.005	3.0
	95% CI	0.06 a 0.51	3.1 a 10.9	-0.42a 0.53	-0.07 a 0.06	1.14 a 4.84
	<i>p</i>	0.01	<0.001	0.83	0.89	0.002
	$R^2$	0.124	-	-	-	-

Modelos de regresión múltiple en el grupo de diabéticos y controles. Se presenta el coeficiente  $\beta$ , intervalo de confianza (CI) del 95%, *p* de cada variable regresora y la  $R^2$  de cada modelo incluyendo la capacidad antioxidante total (CAT) en plasma y eritrocitos, malondialdehído (MDA), glutatión (GSH) y la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos (SOD) como variables dependientes.

### 7.2.2. Actividad de las enzimas antioxidantes

Las actividades de la enzima glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en el plasma no fueron diferentes en los grupos estudiados (Figura 7a, b). Solamente, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa disminuyó en el grupo de sujetos prediabéticos en comparación con los sujetos diabéticos no controlados (hemoglobina glucosilada  $\geq 7\%$ ).

La actividad de gama glutamato cisteína ligasa se observó disminuida en los sujetos con pobre control glucémico, en comparación con el grupo control y prediabetes (Figura 7c). Sin embargo, no se encontró asociación significativa al ajustar la actividad de  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa por la edad, el género, IMC, glucosa y hemoglobina glucosilada. En cambio, la actividad de la enzima superóxido dismutasa fue mayor en los sujetos diabéticos en comparación con el grupo control (Figura 7d) y se asoció positivamente con la edad, el género y la hemoglobina glucosilada en los modelos de regresión múltiple (Tabla 6).



**Figura 7. Actividad de las enzimas antioxidantes.** Actividad plasmática de (a) glutatión peroxidasa (GPx), (b) glutatión reductasa (GR) y (c)  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa ( $\gamma$ -GCL) y (d) superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD-1) en eritrocitos hemolizados. CTRL: Control, PRE: prediabetes, DM2-NC: sujetos diabéticos con pobre control glucémico (hemoglobina glucosilada  $\geq 7\%$ ), DM2-C: sujetos diabéticos en control glucémico (hemoglobina glucosilada  $< 7\%$ ). Cada barra representa la media  $\pm$  S.E. Significancia estadística de  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs CTRL, <sup>b</sup> vs PRE.

### 7.2.3. Efecto de la acumulación de enfermedades metabólicas y el tabaquismo en el estado redox de los sujetos de estudio

Se ha establecido que las enfermedades metabólicas (dislipidemias, el sobrepeso u obesidad y la hipertensión) y el tabaquismo pueden favorecer el estrés oxidante. Para evaluar el efecto de la acumulación de estas condiciones metabólicas en el desarrollo de estrés oxidante en los sujetos de estudio, el grupo de controles y prediabéticos se dividió en dos grupos cada uno, de acuerdo a la presencia de una o más enfermedades metabólicas y/o el hábito de fumar más de 3 cigarrillos por semana (Tabla 7).

**Tabla 7.** Criterios de división de los grupos de estudio para evaluar el efecto de la acumulación de enfermedades metabólicas y el tabaquismo en el estado redox.

Grupo	Criterios de inclusión iniciales	Codificación	Criterios de división de grupos
Controles n=260	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Individuos no diabéticos</li> <li>- Glucemia en ayunas &lt;100 mg/dL</li> <li>- Hemoglobina glucosilada &lt;5.7%</li> <li>- HOMA-IR&lt;2.5</li> </ul>	CTRL1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IMC &lt;25</li> <li>- no hipertensos</li> <li>- no dislipidémicos</li> <li>- no fumadores</li> </ul>
		CTRL2	Con una o más de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> <li>- IMC ≥ 25</li> <li>- Hipertensión arterial</li> <li>- Alguna dislipidemia</li> <li>- Fumador habitual</li> </ul>
Prediabéticos n=116	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Individuos no diabéticos</li> <li>- Glucemia en ayunas entre 100 y 125 mg/dL</li> <li>- Hemoglobina glucosilada entre 5.7 y 6.4%</li> <li>- HOMA-IR≥2.5</li> </ul>	PRE1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IMC &lt;25</li> <li>- no hipertensos</li> <li>- no dislipidémicos</li> <li>- no fumadores</li> </ul>
		PRE2	Con una o más de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> <li>- IMC ≥ 25</li> <li>- Hipertensión arterial</li> <li>- Alguna dislipidemia</li> <li>- Fumador habitual</li> </ul>
Diabéticos n=183	Individuos con diagnóstico previo de diabetes	DM2-C	Hemoglobina glucosilada <7%
		DM2-NC	Hemoglobina glucosilada ≥ 7%

HOMA-IR: modelo de evaluación de homeostasis de la resistencia a insulina.

Los sujetos hipertensos incluidos en los grupos correspondientes, se definieron como aquellos que refirieron ser previamente diagnosticados y/o tomar algún

fármaco anti hipertensivo. Aquellos sujetos que no se reconocieron como hipertensos y en la medición de la presión arterial sistólica dieron valores mayores a 140 (mmHg) fueron tomados como hipertensos. Para los sujetos con dislipidemias se tomó en cuenta tener hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia previamente diagnosticada con o sin tratamiento. Aquellos individuos que no refirieron ser diagnosticados con alguna de estas condiciones y presentaron valores de colesterol total mayor a 250 mg/dL y/o triglicéridos mayor a 200 mg/dL, fueron incluidos en los grupos de enfermedades metabólicas (CTRL2 y PRE2).

Las características clínicas de cada grupo se presentan en la Tabla 8, en donde se observa que tan sólo 6.9% de los 260 individuos se clasificaron como “controles sanos”, es decir, sujetos que no presentaban obesidad, no fumadores, no dislipidémicos y/o no hipertensos. De forma similar, en el grupo de individuos prediabéticos, sólo 5.1% de estos sujetos presentó prediabetes sin ninguna otra enfermedad crónica o consumo de tabaco. Todos los individuos clasificados en los grupos con enfermedades metabólicas (CTRL2 y PRE2) presentaron al menos 2 características de selección.

En cuanto al género, las mujeres se encontraron en mayor frecuencia en los grupos de sujetos sanos (grupo CTRL1 y PRE1) y con diabetes controlada, que en sus respectivos grupos. Los valores de glucosa, hemoglobina glucosilada y triglicéridos se encontraron elevados significativamente en los sujetos prediabéticos 2 y diabéticos. Mientras que el colesterol HDL se encontró elevado en los grupos prediabéticos sin enfermedades metabólicas, éste se observó disminuido en el grupo de diabéticos controlados. No se encontraron diferencias significativas en el colesterol total y el colesterol LDL.

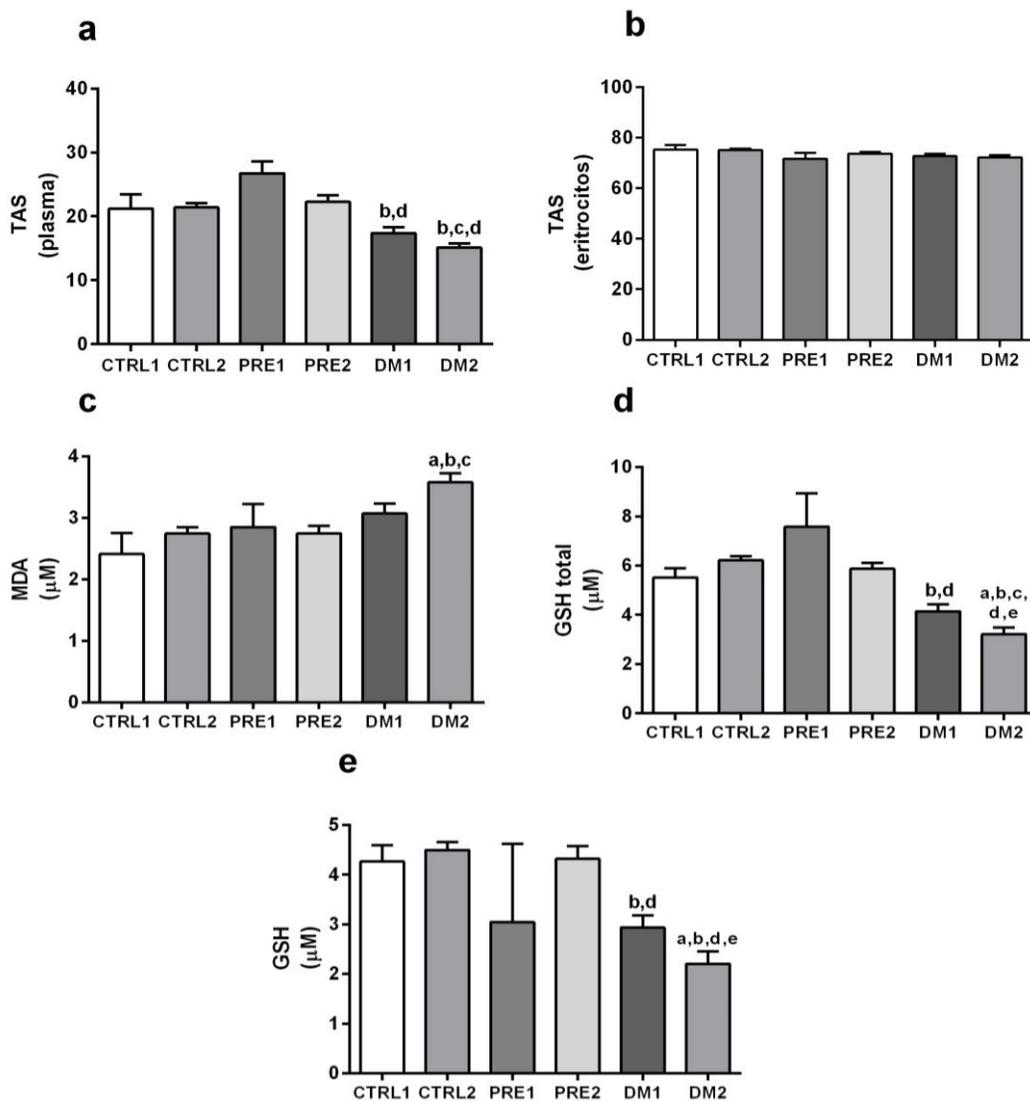
**Tabla 8.** Características clínicas y antropométricas de los grupos divididos de acuerdo a la presencia de 1 o más enfermedades metabólicas.

<b>Variables</b>	<b>CTRL1 n = 18</b>	<b>CTRL2 n = 242</b>	<b>PRE1 n = 6</b>	<b>PRE2 n=110</b>	<b>DM1 n=98</b>	<b>DM2 n=87</b>
Edad (años)	45 (38-50)	48 (42-53)	49 (37-61.5)	50 (43-53.5)	57 (50-65) <sup>a,b,c</sup>	56 (50-64) <sup>a,b,c</sup>
Masculino, n(%)	7 (2.7)	114 (44.5)	1 (0.4)	47 (18.3)	37 (14.4)	50 (19.5)
Femenino, n(%)	11 (3.6)	127 (42)	5 (1.6)	62 (20)	61 (20)	27 (12)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23.4 (22-25)	28 (26-30)	23.1 (22-25) <sup>b</sup>	31.8 (28-34.5) <sup>a,b,c</sup>	29.5 (26-32.5) <sup>a,c,d</sup>	29.5 (26-31) <sup>a,c,d</sup>
PAS (mmHg)	105 (110-115)	115 (110-120)	106.3 (110-112)	118 (110-130) <sup>a</sup>	122 (112-130) <sup>a,b,c</sup>	119 (110-130) <sup>a,b</sup>
PAD (mmHg)	70.6 (60-80)	75 (70-80)	73.3 (70-80)	78.3 (70-80) <sup>a,b</sup>	78 (70-85) <sup>a,b</sup>	76 (70-80)
Tabaquismo, n(%)	0	61 (25.5)	0	29 (26.6)	18 (18.3)	17 (19.5)
Glucosa (mg/dL)	88 (84-94)	91.3 (86-97)	100 (91-112)	107 (99-113) <sup>a,b</sup>	130 (98-142) <sup>a,b</sup>	176 (123-226) <sup>a,b,d,e</sup>
HbA1c (%)	4.4 (4.1-4.8)	4.6 (4.2-5.1)	5.2 (4.4-5.8)	5.1 (4.5-5.6) <sup>b</sup>	5.8 (5.5-6.2) <sup>a,b,d</sup>	8.8 (7.4-10) <sup>a,b,c,d,e</sup>
HOMA-IR	1.8 (1.3-2.3)	4.8 (3.2-5.9)	-			
T-G (mg/dL)	123 (83-131)	171 (108-214)	143 (99-194)	232 (133-259) <sup>a</sup>	193 (120.5-245) <sup>a</sup>	244 (128-245) <sup>a</sup>
C-T (mg/dL)	174 (149-211)	196 (169-217)	191 (175-203)	196 (168-219)	185 (148-220)	186 (150-208)
HDL (mg/dL)	48.6 (43-54)	51 (43-59)	53 (45-59) <sup>b</sup>	45.5 (38-53)	43.5 (36-55) <sup>b</sup>	44 (34-54)
LDL (mg/dL)	104.5 (88-122)	113 (94-132)	116 (97-133)	110 (88-131)	113.5 (85-134)	107 (71-127)

Los datos se presentan como la media (rango intercuartílico). IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, HOMA-IR: modelo de evaluación de la homeostasis de la resistencia a la insulina, HbA1c: hemoglobina glucosilada, T-G: triglicéridos, C-T: colesterol total, HDL: colesterol de alta densidad, LDL: colesterol de baja densidad. Significancia estadística: p<0.05: <sup>a</sup> vs CTRL1, <sup>b</sup> vs CTRL2, <sup>c</sup> vs PRE1, <sup>d</sup> vs PRE2, <sup>e</sup> vs DM1.

### 7.2.4. Efecto del conjunto de enfermedades metabólicas en los marcadores de estrés y actividad de enzimas antioxidantes

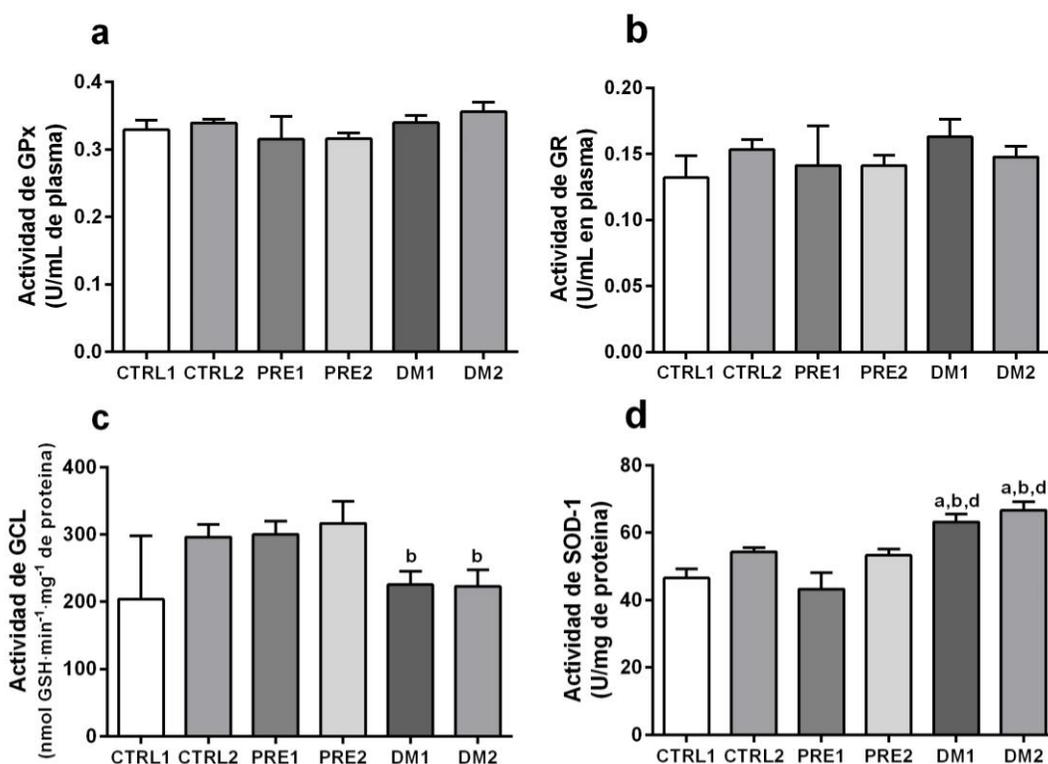
La división de los sujetos controles en sujetos controles sanos (CTRL1) y sujetos controles con una o más enfermedades metabólicas (CTRL2), no modificó de manera significativa los marcadores del estado redox evaluados. Esta tendencia se observó en los grupos de los sujetos prediabéticos (Figura 8).



**Figura 8. Capacidad antioxidante y marcadores de estrés en grupos clasificados por la presencia de una o más enfermedades metabólicas.** (a) Capacidad antioxidante total (TAS) expresado en % de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en plasma y (b) en eritrocitos; (c) concentración de malondialdehído (MDA) en plasma; (d) concentración de glutatión total (GSH) y (e) concentración de glutatión reducido (GSH) en plasma. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E. Significancia estadística de  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs CTRL1, <sup>b</sup> vs CTRL2, <sup>c</sup> vs PRE1, <sup>d</sup> vs PRE2, <sup>e</sup> vs DM1.

Sin embargo, hay que considerar que el tamaño de muestra de los grupos control sano y prediabéticos sin otras enfermedades metabólicas, son muy bajas (n=18 y n=6, respectivamente) por lo que las tendencias no resultaron significativas. Es evidente que la hiperglicemia tiene un efecto directo sobre tales marcadores, ya que estos se modificaron en los grupos de individuos diabéticos.

La actividad de las enzimas antioxidantes presentó el mismo efecto de la hiperglicemia sobre la disminución de la actividad de  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa en eritrocitos respecto al grupo control con enfermedades metabólicas (Figura 9).



**Figura 9. Actividad de las enzimas antioxidantes en individuos clasificados por la presencia de una o más enfermedades metabólicas.** Actividad plasmática de (a) glutatión peroxidasa (GPx), (b) glutatión reductasa (GR) y (c)  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa ( $\gamma$ -GCL) y (d) superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD) en eritrocitos lisados. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E. Significancia estadística de  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs CTRL1, <sup>b</sup> vs CTRL2, <sup>c</sup> vs PRE1, <sup>d</sup> vs PRE2, <sup>e</sup> vs DM1.

En cambio, en la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos, se observó un incremento de la actividad para los grupos con diabetes mellitus, independientemente de los niveles de hemoglobina glucosilada o de la presencia de una o más enfermedades metabólicas como obesidad, dislipidemias, hipertensión o

hábitos de tabaquismo. Ningún cambio se observó en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en el plasma de los individuos de estudio.

Para ajustar el error causado por el tamaño de muestra, se realizaron modelos de regresión lineal multivariada, para explorar si alguna variable en los sujetos controles y prediabéticos podía explicar la distribución de cada uno de los marcadores de estrés. En la Tabla 9 se presentan las variables que se asociaron significativamente con los marcadores del estado redox.

**Tabla 9.** Asociaciones significativas de marcadores del estado redox y actividades antioxidantes en pacientes diabéticos.

Marcador redox	Variable asociada	P de asociación en el modelo	R <sup>2</sup> del modelo	P del modelo
CAT plasma	HbA1c	0.006	0.09	0.010
	C-T	0.041		
	T-G	0.046		
	Ac. Ur.	0.011		
CAT en eritrocitos	HbA1c	0.010	0.40	<0.001
	Género	0.002		
SOD- 1	HbA1c	0.009	0.13	0.009
	HOMA-IR	0.004		
	Género	0.021		
	IMC	0.033		

Modelos de regresión lineal múltiple en individuos controles y prediabéticos. Se presenta la P del coeficiente  $\beta$  confianza (P de asociación de la variable en el modelo), la R<sup>2</sup> de cada modelo y la significancia del modelo. CAT: capacidad antioxidante en plasma y eritrocitos, (SOD-1): actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos, HbA1c: hemoglobina glucosilada, C-T: colesterol total, T-G: triglicéridos, Ac. Ur.: ácido úrico, Género: codificado como 0=si y 1=no, HOMA-IR: modelo de evaluación de la homeostasis de la resistencia a la insulina e IMC: índice de masa corporal.

Como variable de asociación (variable regresora) se incluyó la edad, el género, la presión arterial sistólica y diastólica, y los parámetros clínicos. Sólo la capacidad antioxidante total en plasma y eritrocitos, y la actividad de superóxido dismutasa pudieron ajustarse con las variables incluidas en el estudio (P<0.05).

### 7.2.5. Efecto del tipo de fármaco antidiabético en los marcadores del estado redox

Se ha demostrado que los marcadores de estrés y la actividad de las enzimas antioxidantes se ven modificados en los pacientes diabéticos de acuerdo a los niveles de hemoglobina glucosilada y éstos, a su vez, se modifican de acuerdo al tipo de fármaco referido por los pacientes. En la Tabla 10 se muestran los niveles de los marcadores del estado redox que resultaron modificados de acuerdo al tipo de tratamiento que refirió seguir cada paciente.

**Tabla 10.** Efecto del fármaco antidiabético en los marcadores del estado redox en los pacientes diabéticos incluidos en el estudio.

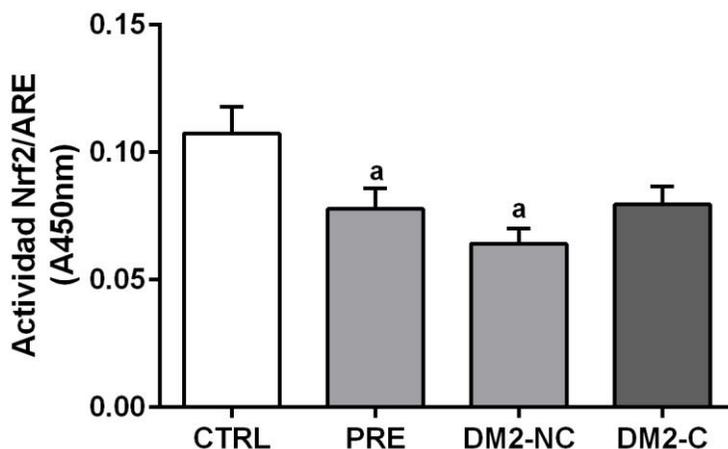
Fármaco	MDA	GSH total	GSH	GR	SOD
Biguanidas	2.6 (1.9-3.3)	5 (3.3-6)	3.8 (1.8-5.3)	0.13 (0.09-0.16)	63 (51-76)
Sulfonilureas	3.2 (3.1-3.5)	4.5 (0.79-7.3)	3.8 (0.5-5.8)	0.3 (0.13-0.22) <sup>a,d</sup>	67 (42-79)
Insulina	3.6 (2.4-3.9)	3.4 (1.2-4)	2.4 (0.4-3.7)	0.19 (0.11-0.25)	66 (50-89)
Biguanida-insulina	3.9 (3-4.1) <sup>a</sup>	2.2 (1.2-2.6) <sup>a,c,d</sup>	1.43 (0.5-1.8) <sup>a,d</sup>	0.15 (0.11-0.16) <sup>b</sup>	78.4 (65-94) <sup>a,c,d</sup>
Biguanida-sulfonilurea	3.2 (2.4-3.7)	3 (2-4) <sup>a,d</sup>	2 (0.7-3)	0.15 (0.09-0.2)	64 (48-74)
No recuerda	3.3 (3.1-4)	4.4 (1.8-7.3)	2.6 (0.3-5.9)	0.18 (0.1-0.17)	49 (36-61)
No se apega al tratamiento	2.8 (2-3.5)	5.3 (3.7-7.4)	3.7 (2.9-4.9)	0.11 (0.08-0.14)	55.8 (42-65)

Los valores se expresan como la media (rango intercuartílico). MDA: concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de malondialdehído, GSH total: concentraciones totales ( $\mu\text{M}$ ) de glutatión reducido más glutatión oxidado, GSH: concentración ( $\mu\text{M}$ ) de glutatión reducido, GR: actividad de glutatión reductasa (U/ml de plasma) y SOD: superóxido dismutasa (U/mg de proteína). Significancia estadística  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs biguanidas, <sup>b</sup> vs sulfonilureas, <sup>c</sup> vs no recuerda y <sup>d</sup> vs no se apega al tratamiento.

En general, la combinación de biguanida-insulina mostró incrementar el estrés oxidante en los pacientes diabéticos en comparación a cuando se utiliza sólo la biguanida o cuando no se apegan al tratamiento. El tratamiento con sulfonilureas mostró incrementar significativamente la actividad de la enzima glutatión reductasa en plasma. Sin embargo, sólo 5 pacientes refirieron estar bajo este tratamiento.

### 7.3. Actividad transcripcional de Nrf2

Para determinar si el estado prediabético y diabético se asocia con la activación de Nrf2, se aislaron las fracciones nucleares a partir de las células mononucleares de sangre periférica de una muestra representativa de cada grupo (Diagrama 1). La actividad transcripcional de Nrf2 nuclear disminuyó en los grupos de prediabéticos y sujetos diabéticos con pobre control glucémico, en comparación con el grupo control (22% y 40% de disminución vs grupo control) (Figura 10).



**Figura 9.** Ensayo de actividad transcripcional de Nrf2. Las proteínas nucleares de CTRL: sujetos control (n = 100), PRE: sujetos prediabéticos (n=68), DM2-NC: sujetos diabéticos con pobre control glucémico (hemoglobina glucosilada  $\geq 7\%$ , n=54), DM2-C: sujetos diabéticos en control glucémico (hemoglobina glucosilada  $< 7\%$ , n=58), se incubaron con el oligonucleótido de ARE (elemento de respuesta antioxidante). Cada barra representa la media  $\pm$  S.E. Significancia: <sup>a</sup> vs CTRL con  $p < 0.05$ .

Se aplicó un modelo de regresión lineal para explicar el efecto de variables como el IMC, la edad, el género, la glucosa y la hemoglobina glucosilada en los sujetos prediabéticos y controles, sin embargo los niveles de Nrf2 no se asociaron con estas variables. En cambio, hubo una asociación independiente con la capacidad antioxidante total en plasma y la actividad de glutatión peroxidasa ( $\beta$ : -0.001,  $p$ : 0.047,  $R^2 = 0.024$ ;  $\beta = 0.2$ ,  $p = 0.008$ ,  $R^2 = 0.05$ ; respectivamente), pero estas asociaciones explican menos del 10% de la variabilidad de Nrf2 en el grupo con prediabetes.

Para explicar la variabilidad en la actividad transcripcional de Nrf2 en los pacientes con diabetes, se realizó un modelo de regresión lineal, transformando los niveles de Nrf2 a escala logarítmica para lograr un buen ajuste y evitar

heterocedasticidad. El modelo incluyó la variable glucosa, hemoglobina glucosilada, edad, sexo, IMC, la hospitalización por episodios de hipoglucemia (0 = no, 1 = sí) y la interacción de la capacidad antioxidante con los niveles de glutatión (Tabla 11). La presión sistólica y diastólica, el tiempo de evolución y los niveles de triglicéridos no se asociaron de forma significativa en los modelos de regresión y por tanto, no fueron incluidos en el modelo multivariado. Para realizar este análisis, los grupos de diabéticos se clasificaron por el control de la glucemia como variables dicotómicas en comparación con el grupo control.

**Tabla 11.** Asociaciones de los niveles de Nrf2 con la hemoglobina glucosilada, edad, hospitalización, y el estrés oxidante.

Variable	$\beta \pm$ S.E. of $\beta$			<i>p</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
HbA1c	-0.1	±	0.04	0.042	0.194
Edad	-0.01	±	0.005	0.045	-
Hospitalización	0.48	±	0.19	0.013	-
DM2-NC	-1.06	±	0.23	<0.001	-
DM2-C	-0.5	±	0.14	0.001	-
CAT * GSH	-0.008	±	0.0004	0.044	-

Regresión lineal múltiple incluyendo en el grupo de diabéticos y controles. Los resultados se muestran como  $\beta \pm$  S.E. de  $\beta$  y la *p* de cada variable regresora. Los datos de Nrf2 fueron transformados a escala log para evitar heterocedasticidad. HbA1c: hemoglobina glucosilada, Hospitalización: hospitalización por eventos hipoglucémicos, 0 = no, 1 = sí, DM2-NC y DM2-C variables dicotómicas donde la DM2-NC incluyen sujetos diabéticos con pobre control de la glucemia (hemoglobina glucosilada  $\geq 7\%$ ) y la DM2-C incluyen los sujetos diabéticos con glucemia controlada (hemoglobina glucosilada  $< 7\%$ ), CAT \* GSH: la interacción del estado antioxidante total (DPPH plasma) y glutatión reducido.

#### 7.4. Efecto de la carga genética en el estado redox

Para la genotipificación de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa (rs4673) y superóxido dismutasa mitocondrial (rs4880), se incluyeron un total de 500 individuos para el grupo control y 500 individuos para el grupo con diabetes.

Se ha observado que los polimorfismos evaluados pueden ser factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares. Teniendo en cuenta que la prediabetes es un estado en el que se puede progresar a la diabetes o a enfermedades cardiovasculares (sin que se progrese necesariamente a diabetes), estos pacientes se excluyeron del estudio.

##### 7.4.1. Genotipificación del polimorfismo rs4673

La distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas de polimorfismo rs4673 en los sujetos diabéticos y no diabéticos se presentan en la Tabla 12. Las frecuencias alélicas se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg ( $X^2 = 2.7$ ,  $P = 0.1$ ). No se observó asociación significativa de las frecuencias con los grupos de estudio.

**Tabla 12.** Frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismo C242T (rs4673) en pacientes diabéticos y no diabéticos.

Genotipo	Diabéticos	Controles	Significancia
	n=500	n=500	
CC, n (%)	351 (63.82)	413 (60.03)	$X^2=2.33$
CT, n (%)	171 (31.09)	230 (33.43)	$P = 0.312$
TT, n (%)	28 (5.09)	45 (6.54)	
Alelo C	0.80	0.76	
Alelo T	0.20	0.23	

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para determinar si el genotipo se encontraba asociado con la glucosa y la hemoglobina glucosilada. Los resultados revelaron una asociación positiva del genotipo expresado como un modelo aditivo, con la hemoglobina glucosilada (Tabla 13), ya que ésta se encontró significativamente

aumentada en los individuos que portan el genotipo TT (Tabla 14). Esta asociación no se encontró con la glucosa.

**Tabla 13.** Asociación del polimorfismo rs4673 con la hemoglobina glucosilada.

Variable	$\beta \pm SE \text{ of } \beta$	<i>P</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
Edad	-0.0036 ± 0.015	0.827	0.189
Género	0.113 ± 0.2	0.709	
IMC	0.017 ± 0.03	0.230	
Obesidad	-0.285 ± 0.4	0.120	
T-G	0.002 ± 0.001	0.078	
T-C	0.005 ± 0.003	0.067	
rs4673	2.29 ± 0.5	<0.000	

El género, la obesidad y el polimorfismo C242T se encuentran como variables dicotómicas. IMC: índice de masa corporal, T-G: triglicéridos y T-C: colesterol total. El polimorfismo rs4673 se presenta bajo un modelo aditivo.

**Tabla 14.** Características de los grupos no diabéticos y diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs4673.

Variable	Diabéticos				No diabéticos			
	TT	CT	CC	P	TT	CT	CC	P
Edad	52.5 ± 7	54 ± 9.5	53 ± 9	0.171	48 ± 7	48 ± 7	48 ± 6	0.784
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 7	29 ± 5	30 ± 6	0.179	28 ± 5	29 ± 4	29 ± 5	0.724
PAS (mmHg)	126 ± 17	124 ± 18	122 ± 16	0.508	111 ± 14	116 ± 14	116 ± 14	0.388
PAD (mmHg)	79 ± 7	78 ± 12	78 ± 10	0.741	73 ± 9.4	78 ± 10	76 ± 10	0.183
Glucosa (mg/dL)	131 ± 41	142 ± 51	155 ± 71	<b>0.033</b>	93 ± 6.5	92.5 ± 7	93 ± 7	0.694
T-G (mg/dL)	166 ± 51	200 ± 97	224 ± 148	<b>0.024</b>	177.5 ± 8	181 ± 96	84 ± 94	0.856
HbA1c (%)	6.7 ± 1.9	7.5 ± 1.9	7.6 ± 2	<b>0.040</b>	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.6	4.4 ± 0.7	0.911
C-T (mg/dL)	198 ± 41	204 ± 45	197 ± 44	0.216	196 ± 31	200 ± 35	203 ± 49	0.424
HDL (mg/dL)	45 ± 8	45 ± 11	45 ± 13	0.974	49 ± 12	47.1 ± 11	49.5 ± 21	0.328
LDL (mg/dL)	121 ± 35	122 ± 33	116 ± 31	0.319	113 ± 33	117 ± 30	118 ± 30	0.571
Urea (mg/dL)	34.3 ± 18.3	32.4 ± 13	35 ± 24	0.487	27.7 ± 7	29.4 ± 8	30 ± 8	0.163
Creat (mg/dL)	0.87 ± 0.3	0.79 ± 0.2	1.1 ± 2.3	0.238	0.77 ± 0.1	0.81 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.577
Ac. Ur. (mg/dL)	5.4 ± 1.3	5.4 ± 1.4	5.4 ± 1.4	0.978	5.26 ± 1.3	5.5 ± 1.3	5.6 ± 1.5	0.195

Los datos se presentan como la media ± D.E. IMC: índice de masa corporal, la PAS: presión arterial sistólica, la PAD: presión arterial diastólica, HbA1c: hemoglobina glucosilada, T-G: triglicéridos, C-T: colesterol total, HDL-C: colesterol de alta densidad, LDL-C: colesterol de baja densidad, Creat: creatinina y Ac.Ur.: ácido úrico.

#### 7.4.2 Genotipificación del polimorfismo rs4880

En la Tabla 15 se presentan la distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas de polimorfismo rs4880 del gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa mitocondrial en los sujetos diabéticos y controles. Las frecuencias de los genotipos en los sujetos controles se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg ( $X^2 = 1.02, P = 0.32$ ).

**Tabla 15.** Frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismo C201T (rs4880) del gen SOD2 en pacientes diabéticos y no diabéticos.

Genotipo	Diabéticos	Controles	Significancia
	n=500	n=500	
CC, n (%)	336 (40.82)	310 (43.66)	$X^2 = 3.1$
CT, n (%)	294 (48.2)	309 (43.52)	0.21
TT, n (%)	67 (10.98)	91 (12.82)	
Alelo C	0.65	0.654	
Alelo T	0.35	0.346	

No se observaron diferencias significativas en las distribuciones de los genotipos en los grupos de estudio. Al analizar las características clínicas de los individuos por genotipo, no se encontró asociación significativa con las variables evaluadas (Tabla 16).

**Tabla 16.** Características de los grupos no diabéticos y diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs4880.

Variables	Diabéticos				Controles			
	TT	CT	CC	P	TT	CT	CC	P
Edad	55 ± 7.5	53 ± 9.5	54 ± 9	0.196	49.5 ± 8	47.9 ± 7.3	48.2 ± 7.2	0.521
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29 ± 4	30 ± 5	30 ± 5.8	0.395	29 ± 5	28.6 ± 4	28.5 ± 4.5	0.329
PAS (mmHg)	121 ± 19	121 ± 15	123 ± 5	0.608	116 ± 13	115 ± 14	117 ± 14	0.695
PAD (mmHg)	77.5 ± 10.5	78 ± 11	77 ± 10	0.585	77.5 ± 9	76 ± 11	78 ± 9.6	0.486
Glucosa (mg/dL)	144 ± 66	153 ± 71	148 ± 64	0.504	93.5 ± 8	92.8 ± 7	92.7 ± 7.5	0.616
HbA1c (%)	6.5 ± 2	6.7 ± 2	7.04 ± 2	0.215	4.3 ± 0.7	4.4 ± 0.7	4.4 ± 0.7	0.977
T-G (mg/dL)	186 ± 67	216.6 ± 158	213 ± 117	0.298	201 ± 117	185 ± 96	179 ± 81	0.131
C-T (mg/dL)	195 ± 44	202 ± 47	194.5 ± 44	0.135	207 ± 30	201 ± 51	200 ± 33	0.422
HDL (mg/dL)	43.6 ± 10.5	45 ± 13	44 ± 13	0.511	49 ± 12	48 ± 11	48 ± 25	0.989
LDL(mg/dL)	118 ± 35.5	122 ± 33	115 ± 30	0.220	119 ± 28	117 ± 32	117 ± 28	0.871
Urea (mg/dL)	38.5 ± 34	33 ± 17	35 ± 23	0.286	30.5 ± 7	29.6 ± 8	30 ± 11	0.693
Creat (mg/dL)	1.6 ± 0.3	0.99 ± 1.4	1.0 ± 1.6	0.240	0.78 ± 0.15	0.8 ± 0.18	0.9 ± 1.1	0.246
Ac. Ur. (mg/dL)	5.7 ± 2	5.4 ± 1.3	5.3 ± 1.4	0.300	5.6 ± 1.6	5.6 ± 1.3	5.5 ± 1.5	0.787

Los datos se presentan como la media ± D.E. IMC: índice de masa corporal, la PAS: presión arterial sistólica, la PAD: presión arterial diastólica, HbA1c: hemoglobina glucosilada, T-G: triglicéridos, C-T: colesterol total, HDL-C: colesterol de alta densidad, LDL-C: colesterol de baja densidad, Creat: creatinina y Ac. Ur.: ácido úrico.

## VIII. DISCUSIÓN

### *Marcadores del estado redox en pacientes prediabéticos*

Desde hace dos décadas se ha establecido que el estrés oxidante juega un papel importante en la patogénesis de la diabetes y sus complicaciones secundarias. Sin embargo, existe poca información acerca del estrés oxidante en individuos con prediabetes. En esta investigación no se observaron cambios significativos en los marcadores de estrés oxidante en estos individuos, tan sólo se observó una disminución de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en los sujetos prediabéticos comparados con los sujetos diabéticos con un pobre control de la glucosa, mas no al comparar con los sujetos control.

Un factor importante del desarrollo de estrés oxidante en el estado prediabético es la edad. En un estudio con individuos prediabéticos mayores de 60 años, se observó que la capacidad antioxidante total en plasma, determinada por el método de 2,2'-azobis-3-ethylbenthiaazoline-6-sulfónico (ABTS), se encuentra disminuida y que los niveles de malondialdehído están aumentados en 28 sujetos prediabéticos ancianos (Dziegielewska-Gęsiak y col., 2014). Los individuos prediabéticos incluidos en este estudio se encuentran por debajo de este rango de edad, lo que puede influir en que los marcadores de estrés no se hayan visto alterados.

Otro factor importante es el tipo de marcador evaluado. Al-Aubaidy y Jelinek (2010), y por su parte, Zengi y sus colaboradores (2011), no encontraron cambios en las concentraciones de glutatión y peroxidación de lípidos en sujetos prediabéticos. No obstante, encontraron mayores niveles de 8-hidroxi-2-desoxi-guanosina (8-OHdG), un marcador de daño oxidante al DNA. Los investigadores sugieren que el daño por estrés oxidante al DNA durante la prediabetes puede ocurrir incluso antes de la peroxidación de lípidos o disminución de las defensas antioxidantes, que se observa durante la diabetes.

Se ha documentado que los pacientes no diabéticos con resistencia a insulina presentan mayores concentraciones de malondialdehído en plasma, lo que correlaciona con una mayor circunferencia de cintura y altos niveles de triglicéridos (Lee, 2001). Una característica importante de los sujetos prediabéticos seleccionados en este estudio, fue que presentaron resistencia a la insulina y la media de los triglicéridos se encontró en niveles limítrofes, sin observar cambios en las concentraciones de malondialdehído. En este estudio sólo el 5% de los pacientes

prediabéticos mostraron tener resistencia a insulina sin alguna condición metabólica adversa. El 95% restante tuvo más de 2 alteraciones, principalmente hipertensión, hipertrigliceridemia, sobrepeso u obesidad, sugiriendo que los individuos clasificados como prediabéticos se encuentran en un estado de síndrome metabólico.

Se ha reportado que la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, y las vitaminas A, E y C disminuyen en sujetos obesos (Ozata y col., 2002; Furukawa y col., 2004). Si bien, en este estudio no se determinó la expresión de las enzimas antioxidantes, los resultados de la actividad de las enzimas antioxidantes revelan que no hay cambios en estos marcadores.

Por tanto, siendo conscientes de que los sujetos controles presentan sobrepeso u obesidad, aunado a que el 24% son fumadores habituales, se decidió hacer una subdivisión para evaluar el comportamiento de los marcadores del estado redox en los pacientes comparados con individuos sanos. Sin embargo, no se observó cambio significativo en los marcadores de estrés y actividad de enzimas antioxidantes.

Para explicar el comportamiento de las variables con mayor robustez, se ajustaron los marcadores de estrés por las características clínicas y antropométricas de los prediabéticos y controles, observando que la hemoglobina glucosilada contribuye a la modulación de la capacidad antioxidante en plasma y eritrocitos, así como en la actividad de la enzima superóxido dismutasa. Sin embargo, la variabilidad de éstos marcadores no puede explicarse del todo por las variables evaluadas, ya que los coeficientes de regresión lineal de cada modelo, son pequeños.

Ante estas discrepancias, hay que tener en cuenta que el tamaño de muestra de los controles sanos resultó muy pequeño en comparación con aquellos individuos que presentan un conjunto de enfermedades metabólicas. Por tanto, sugerimos que un estudio más fino, con un tamaño de muestra más grande de individuos sanos, puede contribuir a aclarar estas discordancias, teniendo en cuenta que la respuesta ante el daño oxidante puede estar dada por la carga genética, el ambiente y la alimentación, parámetros que no se determinaron en este estudio.

### ***Marcadores del estado redox en pacientes diabéticos***

Se han descrito ampliamente los mecanismos por los cuáles la hiperglicemia crónica puede provocar estrés oxidante en la diabetes, observándose disminución en la capacidad antioxidante total asociado a la disminución de glutatión y de la actividad

de enzimas antioxidantes, y mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial (Sohal y col., 2002).

En el presente estudio se observó disminución de la capacidad antioxidante total en plasma y eritrocitos, en las concentraciones de glutatión total y reducido, y menor actividad de la enzima gama glutamato cisteína ligasa. En cambio, las concentraciones de malondialdehído y la actividad de superóxido dismutasa se incrementaron en los sujetos diabéticos. Estas modificaciones dependieron de los niveles de hemoglobina glucosilada, asociado al control de la enfermedad y se asociaron al tipo de fármaco antidiabético referido.

Se observó que los niveles de hemoglobina glucosilada varían dependiendo del fármaco referido. Los resultados sugieren que la combinación de biguanidas con insulina no es favorable tanto en el control de la enfermedad así como en el combate al estrés oxidante y resulta mejor el uso de biguanida sola. La metformina es el fármaco tipo biguanida más utilizado en las clínicas para el control de la enfermedad. Se ha demostrado que tiene acción antioxidante y anti-inflamatoria (Skrha y col., 2007; Formoso y col., 2008; Ansari y col., 2008). Estos resultados también pueden asociarse al tiempo de evolución de la enfermedad, ya que las biguanidas solas se utilizan cuando la enfermedad se diagnostica recientemente.

Los resultados observados por el tratamiento y el tiempo de evolución no son concluyentes, ya que existen cuatro limitaciones importantes:

- a) Las dosis de cada fármaco utilizado difieren entre individuos.
- b) No todos los pacientes realmente se apegan al tratamiento.
- c) El tiempo de evolución referido refleja el tiempo que los pacientes recuerdan que se les diagnosticó la enfermedad, aunque ésta ha estado presente años atrás
- d) La información referida por los pacientes no es del todo certera ya que algunos pacientes no recordaron el fármaco que utilizan o el tiempo de evolución referido depende de una estimación.

Ante estas limitaciones, la medición de la hemoglobina glucosilada es una buena herramienta para determinar el control de la hiperglucemia. Esto se confirmó al realizar los modelos de regresión lineal multivariados para explicar la variabilidad de cada marcador del estado redox en los pacientes diabéticos. Se observó que la hemoglobina glucosilada se asocia con la disminución de la capacidad antioxidante total y las concentraciones de glutatión, y el incremento de malondialdehído y la

actividad de superóxido dismutasa. Sin embargo, otras variables como la edad, el género y el IMC tienen un efecto importante en la variabilidad de los marcadores redox evaluados.

El estado antioxidante total refleja la capacidad que poseen las enzimas y los compuestos no enzimáticos tanto exógenos como endógenos, de reducir las especies reactivas del medio en el que se encuentren. En esta investigación se observó que el incremento de la edad y la hemoglobina glucosilada se asocian negativamente con la capacidad antioxidante. Además, el hecho de ser mujer incrementa el riesgo de que disminuya la capacidad antioxidante en plasma, aunado a la disminución del antioxidante endógeno glutatión.

En estudios previos se ha encontrado una disminución de los niveles de glutatión durante la hiperglicemia en plasma y eritrocitos (Yoshida y col., 1995; Seghieri y col., 2000; Kalkan y Suher, 2013). En la presente investigación se encontraron disminuidos los niveles de glutatión total y glutatión reducido en los pacientes diabéticos. No obstante, la relación entre glutatión reducido y glutatión oxidado (o glutatión disulfuro), no se afectó significativamente en los grupos estudiados. Esto puede deberse al hecho de que las actividades plasmáticas de la enzima glutatión reductasa y glutatión peroxidasa, encargadas del reciclamiento de glutatión, no se modificaron, sugiriendo que la caída de las concentraciones de glutatión se debe a defectos en su biosíntesis.

Cuando los sujetos diabéticos están en control de la glucemia en ayunas, medido por la hemoglobina glucosilada (<7%) como lo indica la ADA (2011), los niveles de glutatión disminuyen en menor magnitud que cuando se encuentran bajo descontrol glucémico. Además, se observó que aquellos pacientes que estaban bajo tratamiento farmacológico con metformina, mostraron mayores concentraciones de glutatión total y reducido. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Pavlović y col. (2000) y por Kulkarni y col. (2014), quienes demostraron que los niveles de glutatión aumentan por el tratamiento con sulfonilureas y biguanidas. De hecho, nuevos estudios se enfocan en el uso de glutatión como un marcador de control de la hiperglucemia (Kulkarni y col., 2014).

En los eritrocitos de pacientes diabéticos no controlados se observó una menor capacidad antioxidante, lo cual se asoció con mayores niveles de hemoglobina glucosilada y a una menor actividad de la enzima  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa, la cual

cataliza la reacción limitante de la velocidad de biosíntesis de glutatión (Franklin y col., 2009).

Interesantemente, en eritrocitos de los pacientes diabéticos se encontró una mayor actividad de la enzima superóxido dismutasa independientemente del control glicémico. Esta enzima se encarga de reducir los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno. Posiblemente, ante un mecanismo de defensa bien establecido, la actividad de superóxido dismutasa eritrocitaria se encuentra más activa para defender a la célula del daño causado por oxidasas (Bandeira y col., 2012; Aouacheri y col., 2014) y evitar la oxidación del oxígeno.

Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el producto de la enzima (peróxido de hidrógeno) es una especie reactiva, lo cual contribuye al mantenimiento del estrés oxidante en los pacientes diabéticos. Por tanto, se sugiere que existe un defecto en la producción o acción de la enzima catalasa o glutatión peroxidasa en eritrocitos, enzimas encargadas de reducir el peróxido de hidrógeno a agua. Nuestros resultados están de acuerdo con esta hipótesis, pero este punto aún es muy controversial. Otros informes indican que la actividad de superóxido dismutasa está disminuida en los pacientes diabéticos (Soliman, 2008). La medición de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, pueden contribuir a esclarecer este punto. Además, hay que tener en cuenta que los factores genéticos podrían alterar la funcionalidad y la actividad de estas enzimas de acuerdo a las poblaciones.

### ***Evaluación de Nrf2 en la diabetes y la prediabetes***

En modelos animales, se reconoce que el estrés oxidante, la inflamación y la resistencia a la insulina tienen una estrecha relación con Nrf2. Este factor regula la expresión de las enzimas que mantienen la homeostasis redox celular incluyendo hemo oxigenasa 1, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, y  $\gamma$ -glutamato cisteína ligasa. Los inductores de Nrf2 mejoran de manera significativa la resistencia a la insulina, disminuyen la masa de adipocitos y previenen la apoptosis en células beta del páncreas (Yu y col., 2011; Zhao y col., 2011; Palsamy y Subramanian., 2011; Bhakkiyalakshmi y col., 2014). Sin embargo, no hay informes de su participación en la prediabetes y diabetes en humanos.

Esta investigación demostró que los niveles de Nrf2 en las fracciones nucleares de las células mononucleares de sangre periférica (leucocitos), son menores en los

sujetos prediabéticos y diabéticos no controlados (hemoglobina glucosilada >7%), lo que indica que su actividad transcripcional se altera durante estas patologías.

Interesantemente, se observó una menor actividad de Nrf2 desde la prediabetes, no obstante las variables incluidas en este estudio no fueron suficientes para explicar la variabilidad de Nrf2 en los individuos prediabéticos. Sólo se encontró una asociación débil con la capacidad antioxidante en plasma y la enzima glutatión peroxidasa, mas estas variables tan sólo explicaron el 5% de la variabilidad de Nrf2 durante la prediabetes.

Se sabe que Nrf2 puede ser activado por algunos antioxidantes de la dieta (Cardozo y col., 2013 y Wu y col., 2014), sin embargo, el consumo de antioxidantes exógenos no se controló en este estudio. En un estudio en sujetos prediabéticos que recibieron un tratamiento oral de curcumina, un activador de Nrf2, durante nueve meses para prevenir el desarrollo de la diabetes (Chuengsamarny col., 2012), se encontró que el grupo tratado con curcumina presentó mejoría de la función general de  $\beta$ -células y ninguno progresó a diabetes tipo 2 en 9 meses. El 16% del grupo con placebo progresó a diabetes tipo 2. Con base en este estudio, se propone que el efecto de los compuestos dietéticos en Nrf2 y la prediabetes puede ser un tema para futuras investigaciones.

En pacientes diabéticos con hemoglobina >7%, se observó una disminución significativa en la actividad de Nrf2. Se esperaba que el estrés oxidante condujera a una mayor activación de los niveles de Nrf2, hecho que no se observó, lo que sugiere que la respuesta de Nrf2 en estos pacientes se encuentra deteriorada. El análisis de regresión sugiere que la falta de inducción de Nrf2 se puede explicar, al menos en parte, por el aumento de los niveles de hemoglobina glucosilada, por la edad y por la disminución concomitante de la capacidad antioxidante y glutatión. Sin embargo, estas variables sólo explicaron el 19% de la variabilidad de los niveles de Nrf2 en la muestra poblacional.

Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual la hiperglucemia provoca una disminución en la activación de Nrf2 en leucocitos. En algunos estudios en los podocitos y cardiomiocitos incubados con altas concentraciones de glucosa se demuestra que la transcripción de Nrf2 se incrementa (He y col., 2009; Wang y col., 2014). En contraste, en los animales con insuficiencia renal crónica se encontró que el estrés oxidante y la inflamación en el riñón se agravan por un defecto en la activación de Nrf2 y la consiguiente regulación a la baja de las enzimas antioxidantes (Kim y

Vaziri, 2010). Sin embargo, se puede especular que durante un estado hiperglucémico continuo se inducen cambios adaptativos que conducen a un efecto negativo en la inducción de Nrf2 por mecanismos aún desconocidos, junto con una condición inflamatoria que puede influir en la activación de Nrf2.

Por otro lado, la carga genética puede tener una mayor influencia en la respuesta de Nrf2. Los SNP's en la región promotora de Nrf2 están asociados con el desarrollo de diferentes enfermedades que tienen en común la presencia de estrés oxidativo (Marzec y col., 2007; Marczak y col., 2012; Chen y col., 2013; Shimoyama y col., 2014) pero hasta el momento no hay registros de su asociación con la diabetes.

Por último, este estudio presenta algunas limitaciones. En primer lugar, no se determinaron la expresión de las enzimas blanco de Nrf2 en los leucocitos, así mismo, no se determinaron otros parámetros tales como los marcadores de inflamación, los cuales están involucrados en la regulación de Nrf2. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que Nrf2 puede ser un objetivo para atenuar las complicaciones diabéticas inducidas por el estrés oxidante desde el estado prediabético.

### ***Estudio de los polimorfismos rs4673 y rs4880***

Se determinaron las frecuencias genóticas del polimorfismo rs4673, que representa un cambio de citosina por timina en la base 242 del gen de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa. Se encontró una asociación positiva de este polimorfismo con niveles más altos de glucosa, la hemoglobina glucosilada y triglicéridos en los sujetos diabéticos que presentan el genotipo CC.

Bajo un modelo aditivo, en el cual se supone que una copia del alelo C modifica el riesgo en una cantidad aditiva y por tanto, los homocigotos CC tienen el doble de riesgo que los heterocigotos TC. Por medio del análisis de regresión ajustando los valores de hemoglobina glucosilada por variables como la edad, el género, el IMC, los niveles de triglicéridos y colesterol, y el genotipo, se observó que el tener el genotipo CC se asocia fuertemente con el incremento de los niveles de hemoglobina. Por tanto, los individuos diabéticos que portan el genotipo TT tienen menor riesgo de incrementar los niveles de hemoglobina glucosilada.

Varios estudios se han centrado en la asociación de este polimorfismo con diversas enfermedades cardiovasculares y renales, linfomas y algunos otros tipos de cáncer. Sin embargo, hay discrepancias acerca del efecto que se produce en la proteína, por la mutación de citosina a timina. Algunos autores han documentado que el

alelo T está asociado con actividad reducida de la enzima NADPH oxidasa, ya que se genera menos radical superóxido, produciendo un efecto protector contra enfermedades cardiovasculares (Guzik y col., 2000) y la hipertensión (Moreno y col., 2006). En otras investigaciones, se encontró aumento en la producción del radical superóxido en los sujetos portadores del alelo T lo que se asoció con alteraciones en el perfil metabólico (Shimo-Nakanishi, 2004). Sin embargo, en el presente estudio no fue posible determinar la producción de radical superóxido por limitaciones en la cantidad de muestra.

La respuesta a los cambios fenotípicos producidos por el polimorfismo rs4673 depende de la población. Este polimorfismo se asoció con una menor prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en población japonesa (Matsunaga-Irie y col., 2004). En contraste, Schreiber y col., (2012) encontraron una asociación del este polimorfismo con la obesidad y la diabetes mellitus en pacientes hipertensos originarios de Brasil. En este sentido, esta investigación mostró la limitante de que los resultados no fueron ajustados por marcadores de ancestría, lo que puede modificar la relación fenotipo-genotipo. Estudios contemplando estos marcadores ayudarán a comprender mejor estas diferencias.

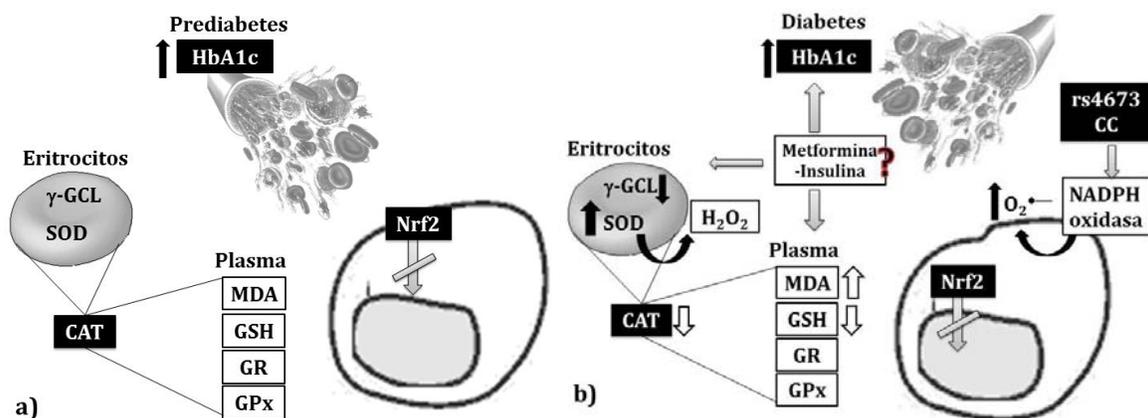
Se ha reportado que la hiperglucemia es el principal factor que induce el estrés oxidante, principalmente por la activación de la NADPH oxidasa en monocitos de pacientes con diabetes (Huang y col., 2011) y es un factor importante en el desarrollo de complicaciones secundarias. Esto es importante porque hay un vínculo entre el descontrol de la hiperglicemia (determinado por las concentraciones de hemoglobina glucosilada) y el desarrollo de las complicaciones diabéticas. Por tanto, los resultados aquí reportados sugieren que la variante rs4673 puede contribuir a explicar la mayor susceptibilidad a desarrollar la diabetes mellitus en individuos mexicanos.

No obstante, el polimorfismo rs4880 no se asoció con la enfermedad o alguna característica clínica en los grupos de estudio. Este polimorfismo se estudió en la población mexicana con macroalbuminuria encontrando que aquellos que portan el genotipo CC tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Ascencio-Montiel, 2013). Este polimorfismo se ha asociado principalmente a enfermedades renales en la diabetes, por lo cual, se puede inferir que la presencia del genotipo CC es un factor de riesgo para enfermedades renales independientemente de la presencia de diabetes.

### Integración de los resultados

En los pacientes prediabéticos se observaron menores niveles de Nrf2 en las fracciones nucleares de los leucocitos, lo cual se sugiere que precede el desarrollo de estrés oxidante en estos pacientes (Figura 11a). En cambio, en los pacientes diabéticos existe un desbalance redox tanto en el incremento de marcadores de estrés, así como en la disminución de enzimas antioxidantes. Además, la hemoglobina glucosilada, que provee una idea del control de la enfermedad, está fuertemente asociada el desarrollo de estrés oxidante, los niveles bajos de Nrf2 en núcleos de leucocitos y puede verse incrementada cuando los individuos sujetos portan el genotipo CC (rs4673) de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa (Figura 11b).

Otros factores como el tratamiento y el tiempo de evolución en la diabetes pueden modular específicamente la respuesta antioxidante y los resultados sugieren que el uso de metformina con insulina, no provee buen control de la enfermedad medido por los niveles de la hemoglobina glucosilada y por el incremento de estrés oxidante.



**Figura 11.** Integración de los resultados en los individuos prediabéticos (a) y diabéticos (b).

Abreviaturas:  $\gamma$ -GCL: gama glutamato cisteína ligasa, SOD: superóxido dismutasa, CAT: capacidad antioxidante total, MDA: malondialdehído, GSH: glutatión, GR: glutatión reductasa, GPx: glutatión peroxidasa, CC: genotipo citosina, rs4673: polimorfismo C242T en la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa.

## **IX. CONCLUSIONES**

En general se concluye que en los pacientes prediabéticos y diabéticos se observó menor actividad transcripcional de Nrf2 en las células mononucleares de sangre periférica. Sin embargo, la variabilidad en los niveles de este factor no se pudo explicar del todo por los marcadores de estrés evaluados en plasma y eritrocitos.

Lo anterior sugiere que la disminución transcripcional de Nrf2 podría preceder al desarrollo de estrés oxidante desde la prediabetes y podría ser un blanco para el tratamiento de la enfermedad y sus complicaciones.

En particular, un común denominador de la modulación del estado redox fue el control de la enfermedad determinado por los niveles de hemoglobina glucosilada, sin olvidar que el tratamiento y el tiempo de evolución modifican la respuesta redox. En este sentido, los resultados sugieren que la combinación de insulina-metformina no provee una buena combinación para combatir el estrés oxidante.

Finalmente, el polimorfismo rs4673 en el gen de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa, se encontró significativamente asociado con la hemoglobina glucosilada. Sin embargo, el polimorfismo rs4880 de la enzima superóxido dismutasa no está asociado con la diabetes en nuestra población.

## **X. PERSPECTIVAS**

A partir de los resultados mostrados en esta investigación, en dónde se establece por primera vez la participación de Nrf2 en sujetos prediabéticos y diabéticos, se considera ampliar la investigación en los siguientes sentidos:

- Establecer como se modulan el estrés y la inflamación en leucocitos de individuos prediabéticos y diabéticos, para explicar la caída en la actividad de Nrf2.
- Se sugiere el estudio del uso de activadores naturales de Nrf2 desde la prediabetes
- Es posible que la respuesta de Nrf2 dependa de factores genéticos, por lo que podrían estudiarse polimorfismos u otras variaciones en este gen.
- Un hecho importante a esclarecer es la relación entre el tratamiento, el tipo de fármaco, la hiperglucemia y el desarrollo de estrés oxidante en la diabetes.

## **XI. BIBLIOGRAFÍA**

- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA (2009). Plasma glucose concentration and prediction of future risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32:194-198.
- Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA (2006). Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 29:1130–1139.
- Ackermann RT, Cheng YJ, Williamson DF, Gregg EW (2011). Identifying adults at high risk for diabetes and cardiovascular disease using hemoglobin A1c National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *Am J Prev Med* 40:11–17
- ADA, American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 33:S62eS69.
- ADA, American Diabetes Association (2014). Standards of medical care in diabetes—2014. *Diab Care* 34: S11–S61.
- Al-Aubaidy H.; Jelinek H (2010). 8-Hydroxy-2-deoxy-guanosine identifies oxidative DNA damage in a rural prediabetes cohort. *Redox Rep* 15:155–160.
- Aleksunes LM, Reisman SA, Yeager RL, Goedken MJ, Klaassen CD (2010). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 deletion impairs glucose tolerance and exacerbates hyperglycemia in type 1 diabetic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 333:140-151.
- Ansari G, Mojtahedzadeh M, Kajbaf F, Najafi A, Khajavi MR, Khalili H, Rouini MR, Ahmadi H, Abdollahi M (2008). How does blood glucose control with metformin influence intensive insulin protocols? Evidence for involvement of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Adv Ther* 25:681-702.
- Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maida I (2014). The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. *Can. J. Diabetes*, doi:10.1016/j.jcjd.2014.03.002.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle CE, Woodlief TL, Kane DA, Lin C-T, Price WJ III, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD (2009). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* 2009: 119:573–581.
- Ascencio-Montiel Ide J1, Parra EJ, Valladares-Salgado A, Gómez-Zamudio JH, Kumate-Rodriguez J, Escobedo-de-la-Peña J, Cruz M (2013). SOD2 gene Val16Ala

- polymorphism is associated with macroalbuminuria in Mexican type 2 diabetes patients: a comparative study and meta-analysis. *BMC Med Genet* 14:110.
- Baird L, Dinkova-Kostova AT (2011). The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85:241–272.
- Bandeira SM, Glaucivane SG, Fonseca LJ, Pires A, Gelain DP, Moreira JC, Rabelo LA, Vasconcelos SM, Goulart MO (2012). Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev* 2012:819310.
- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedús B, Demarex N, Krause KH (2001). A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, lymph nodes. *J Biol Chem* 276:37594–37601.
- Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA (2004). Role of the adipocytes, FFA, and ectopic fat in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: PPAR agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89:463–478.
- Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.
- Beyer TA, Xu W, Teupser D, auf dem Keller U, Bugnon P, Hildt E, Thiery J, Kan YW, Werner S (2008). Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J* 27:212-223.
- Bhakkialakshmi E, Shalini D, Sekar T, Rajaguru P, Paulmurugan R, Ramkumar K (2014). Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. *Br. J. Pharmacol.* 171:1747–1757.
- Brand MD, Nicholls DG (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435:297-312.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122–2125.
- Cardozo LF, Pedruzzi LM, Stenvinkel P, Stockler-Pinto MB, Daleprane JB, Leite MJr, Mafra D (2013). Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie* 95:1525–1533.
- Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat MA, Thorpe JE, Testa R, Boemi M, Giugliano D (2008). Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and

- oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57:1349–1354.
- Chang CL, Au LC, Huang SW, Fai Kwok C, Ho LT, Juan CC (2011). Insulin up-regulates heme oxygenase-1 expression in 3T3-L1 adipocytes via PI3-kinase- and PKC-dependent pathways and heme oxygenase-1-associated microRNA downregulation. *Endocrinology* 152:384-393.
- Chang TJ, Weaver JR, Bowman A, Leone K, Raab R, Vinik AI, Pittenger GL, Taylor-Fishwick DA (2010). Targeted expression of islet neogenesis associated protein to beta cells enhances glucose tolerance and confers resistance to streptozotocin induced hyperglycemia. *Mol.Cell Endocrinol* 335:104–109.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky J (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry* 278:36027–36031.
- Chen Y, Wu Y, Wu Y, Lee-Chen G, Chen C (2013). Genetic analysis of NFE2L2 promoter variation in Taiwanese Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 19:247–250.
- Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Luechapudiporn R, Phisalaphong C, Jirawatnotai S (2012). Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 35:2121–2127.
- DeFronzo RA (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88:787–835.
- DeFronzo RA (2009). Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58:773-795.
- DeFronzo RA, Abdul-Ghani MA (2011). Preservation of  $\beta$ -cell function: the key to diabetes prevention. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2354-2366.
- Di Castelnuovo A, Soccio M, Iacoviello L, Evangelista V, Consoli A, Vanuzzo D, Diviacco S, Carluccio M, Rignanese L, De Caterina R (2008). The C242T polymorphism of the p22phox component of NAD(P)H oxidase and vascular risk. Two case-control studies and a meta-analysis. *Thromb Haemost* 99: 594-601.
- Duarte AI, Santos P, Oliveira, CR, Santos MS, Rego AC, 2008. Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 beta signaling pathways and changes in protein expression. *Biochim Biophys Acta* 1783: 994–1002.

- Dziegielewska-Gesiak S, Wysocka E, Michalak S, Nowakowska-Zajdel E, Kokot T, Muc-Wierzgoń M (2014). Role of lipid peroxidation products, plasma total antioxidant status, and Cu-, Zn-superoxide dismutase activity as biomarkers of oxidative stress in elderly prediabetics. *Oxid Med Cell Longev* 2014:987303.
- Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID (2005). The molecular basis for oxidative stress induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal.* 7:1040–1052.
- Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions* 5: 94–111.
- Fernández-Cantón S (2006). El IMSS en cifras: El censo de pacientes diabéticos, 2004. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 44:375–82.
- FID, Federación Internacional de Diabetes, 2013. Atlas de la diabetes (6th Edn. en español.) <http://www.idf.org/diabetesatlas> (visitado en Enero, 2015).
- Forbes JM, Cooper ME (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93:137–188.
- Forman HJ, Torres M, Fukuto J (2002). Redox signaling. *Mol Cell Biochem* 234-235:49-62.
- Formoso G, De Filippis EA, Michetti N, Di Fulvio P, Pandolfi A, Bucciarelli T, Ciabattini G, Nicolucci A, Davì G, Consoli A (2008). Decreased in vivo oxidative stress and decreased platelet activation following metformin treatment in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Metab Res Rev* 24:231-237.
- Franklin C, Backos D, Mohar I, White C, Forman H, Kavanagh T (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med* 30:86–98.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Investig* 114:1752–1761.
- Gao L, Mann GE (2009). Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signaling. *Cardiovasc Res* 82:9–20.
- Gaona-Gaona L, Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, Hernández-Pando R, Calderón-Oliver M, Zarco-Márquez G, Pinzón E, Pedraza-Chaverri J (2011). Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 286:20-27.
- Geiszt M (2006). NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res* 71: 289-299.

- Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P, Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003). Followup report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26:3160–3167.
- Geraldes P, Yagi K, Ohshiro Y, He Z, Maeno Y, Yamamoto-Hiraoka J, Rask-Madsen C, Chung SW, Perrella MA, King GL (2008). Selective regulation of heme oxygenase-1 expression and function by insulin through IRS1/phosphoinositide 3-kinase/Akt-2 pathway. *J Biol Chem* 283:34327-34336.
- Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Martínez-Abundis E, Tapia E, Zarco-Márquez G, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J (2010). Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and  $\gamma$  glutamyl cysteine ligase: studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells. *Toxicol Lett* 199:80-92.
- Gibson G, Muse SV (2004). *A Primer of Genome Science*, 2nd Edition. Sinauer Associates.
- Giugliano D, Ceriello A, Esposito K (2008). Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am J Clin Nutr* 87:217-222.
- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, (2000). Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 102:1744-1747.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4th. Clarendon Press, Oxford.
- Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Ohtoshi K, Yasuda T, Katakami N, Hirano T, Yoshino G, Kajimoto Y, Hori M (2002). NAD(P)H oxidase p22 phox C242T polymorphism affects LDL particle size and insulin resistance in Japanese subjects. *J Atheroscler Thromb* 9:200-205.
- He HJ, Wang GY, Gao Y, Ling WH, Yu ZW, Jin TR (2012). Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World J Diabetes* 3:94-104.
- He M, Siow RC, Sugden D, Gao L, Cheng X, Mann GE (2011). Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role

- for Nrf2 in vascular protection in diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21:277-285.
- Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM (2011). Oxidative Stress and the Etiology of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Free Radic Biol Med* 51: 993–999.
- Hermann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S (2000). Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: a potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:402–409.
- He X, Kan H, Cai L, Ma Q (2009). Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 46:47-58.
- Hitman GA, McCarthy MI (1991). Genetics of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Bailliere's Clin. Endocrinol Metab* 5:455–476.
- Holst JJ, Gromada J (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:199–206.
- Huang X, Sun M, Li D, Liu J, Guo H, Dong Y (2011). Augmented NADPH oxidase activity and p22phox expression in monocytes underlie oxidative stress of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 91:371-80.
- INSP, Instituto Nacional de Salud Pública 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Daños y Servicios de Salud. Disponible en línea: <http://consulta.mx/web/index.php/estudios-e-investigaciones/otros-estudios/502-encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-2012-ensanut> (último acceso el 8 de agosto 2014).
- International Expert Committee (2009). International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 32:1327–1334
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M (2004). Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36:1208–1213.
- Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst J (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 38:1539–1543.
- Johnson EL (2012). Glycemic variability in type 2 diabetes mellitus: Oxidative stress and macrovascular complications. *Adv Exp Med Biol* 771:139–154.
- Jones DA, Prior SL, Tang TS, Bain SC, Hurel SJ, Humphries SE, Stephens JW (2010). Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and

- coronary heart disease in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 90: 196-201.
- Kalkan H, Suher M (2013). The relationship between the level of glutathione, impairment of glucose metabolism and complications of diabetes mellitus. *Pak J Med Sci* 29:938–942.
- Kang S, Song J, Kang H, Kim S, Lee Y, Park D (2003). Insulin can block apoptosis by decreasing oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase- and extracellular signal-regulated protein kinase-dependent signaling pathways in HepG2 cells. *Eur J Endocrinol* 148:147–155.
- Kapiszewska M (2006). A vegetable to meat consumption ratio as a relevant factor determining cancer preventive diet. *Local Mediterranean Food Plants and Nutraceuticals*. Editores: Heinrich M, Müller WE, Galli C. Ed. Karger, vol. 59:130-153.
- King GL, Loeken MR (2004). Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol* 122: 333-8.
- Kim HJ, Vaziri ND, (2010). Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F662–F671.
- Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S (2003). The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* 52:380–386.
- Koren E, Kohen R, Ginsburg I (2010). Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 235:ssd689–699.
- Kulkarni R, Acharya J, Ghaskadbi S, Goel P (2014). Thresholds of oxidative stress in newly diagnosed diabetic patients on intensive glucose-control therapy. *PLoS One* 9:e100897.
- Kumar H, Kim IS, More SV, Kim BW, Choi DK (2014). Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat Prod Rep* 31:109-139
- Kuznetsova T, Gavrilov DV, Dudanov IP, Makarevich PI, Balatskiĭ AV, Samokhodskaia LM, Parfenova EV (2008). Influence of polymorphism's of endothelial nitric oxide synthase gene and polymorphism of NADPH oxidase gene on development of complications of arterial hypertension. *Kardiol* 48: 27-33.

- Lahiri DK, Nurnberger JI (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444.
- Lee KU (2001). Oxidative stress markers in Korean subjects with insulin resistance syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 54:S29-33.
- Leibowitz G, Bachar E, Shaked M, Sinai A, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N (2010). Glucose regulation of  $\beta$ -cell stress in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 12: 66–75.
- Li J, Ichikawa T, Janicki JS, Cui T (2009). Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets* 13:785-794.
- Liu L, Zheng T, Wang N, Wang F, Li M, Jiang J, Zhao R, Li L, Zhao W, Zhu Q, Jia W (2009). The manganese superoxide dismutase Val16Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 322: 87-91.
- Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S (2004). Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5535-5541.
- Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Marselli L y Boggi U (2010). The beta-cell in human type 2 diabetes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 654:501–514.
- Marczak ED, Marzec J, Zeldin DC, Kleeberger SR, Brown NJ, Pretorius M, Lee CR (2012). Polymorphisms in the transcription factor NRF2 and forearm vasodilator responses in humans. *Pharmacogenet Genomics* 22:620–628.
- Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lanken PN, Aplenc R, Yamamoto T, Yamamoto M, Cho HY, Kleeberger SR (2007). Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J* 21:2237–2246.
- Matsuda M, DeFronzo RA, Glass L, Consoli A, Giordano M, Bressler P, DelPrato S (2002). Glucagon dose response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2 diabetic patients and normal individuals. *Metabolism* 51:1111–1119.
- Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, (2004). Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T

- and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27:303-307.
- Matsunaga S, Maruyama T, Yamada S, Motohashi Y, Shigihara T, Shimada A, Saruta T (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) P22phox C242T gene polymorphism in type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 1005: 324-327.
- Ma ZA, Zhao Z, Turk J (2012). Mitochondrial dysfunction and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res* 2012:703538.
- Mehranpour P, Wang SS, Blanco RR, Li W, Song Q, Lassègue B, Dikalov SI, Austin H, Zafari AM (2009). The C242T CYBA polymorphism as a major determinant of NADPH oxidase activity in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 7:251-259.
- Meier JJ, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH, Nauck MA (2001). Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in firstdegree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:2497-2504.
- Moreno MU, San Jose G, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G (2006). The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens* 24:1299-1306.
- Moreno MU, Zalba G (2010). CYBA gene variants as biomarkers for coronary artery disease. *Drug News Perspect* 23: 316-324.
- Nakano T, Matsunaga S, Nagata A, Maruyama T (2003). NAD(P)H oxidase p22phox Gene C242T polymorphism and lipoprotein oxidation. *Clin Chim Acta* 335:101-7.
- Nakayama M, Inoguchi T, Sonta T, Maeda Y, Sasaki S, Sawada F, Tsubouchi H, Sonoda N, Kobayashi K, Sumimoto H, Nawata H (2005). Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of Type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 927-933.
- Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R, Carpinelli A (2009). Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia* 52:2489-2498.
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 284:13291-13295.

- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:233–260.
- Ogasawara A, Simizu S, Ito A, Kawai T, Saisho Y, Takei I, Umezawa K (2013). Inhibition of NO induced  $\beta$ -cell death by novel NF- $\kappa$ B inhibitor (-)-DHMEQ via activation of Nrf2-ARE pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 433:181-187.
- Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Hatazaki M, Hazama Y, Hori M (2003). Association of NAD(P)H oxidase p22phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:458–463.
- OMS, Organización Mundial de la Salud, International DF (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: World Health Organization.
- Orrenius S (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters* 149: 19–23.
- Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, Yilmaz MI, Sayal A, Isimer A, Ozdemir IC (2002). Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem* 35:627–631.
- Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C (2005). Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* 12:267–275.
- Pacher P, Szabó C (2006). Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 6:136–141.
- Palsamy P, Subramanian S (2011). Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1812:719-731.
- Pavlovic D, Kocić R, Kocić G, Jevtović T, Radenković S, Mikić D (2000). Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2:251–256.
- Perianayagam MC, Liangos O, Kolyada AY, Wald R, MacKinnon RW, Li L, Rao M, Balakrishnan VS, Bonventre JV, Pereira BJ, Jaber BL (2007). NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative

- stress and adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 18:255-263.
- Pi J, Leung L, Xue P, Wang W, Hou Y, Liu D, Yehuda-Shnaidman E, Lee C, Lau J, Kurtz TW, Chan JY (2010). Deficiency in the nuclear factor E2-related factor-2 transcription factor results in impaired adipogenesis and protects against diet-induced obesity. *J Biol Chem* 285:9292-9300.
- Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C (2013). Oxidative Stress in Diabetes: Implications for vascular and other Complications. *Int J Mol Sci* 14:21525-21550.
- Rabêlo LA, Souza VN, Fonseca LJ, Sampaio WO (2010). Redox unbalance: NADPH oxidase as therapeutic target in blood pressure control. *Arq Bras Cardiol* 94:643-651.
- Rafacho A, Ortsäter H, Nadal A, Quesada I (2014). Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J Endocrinol* 223:49-62.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 1:3159-3165.
- Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS (2005). Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal* 7:619-626.
- Rochette L, Zeller M, Cottin, Vergely C (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840:2709-2729.
- Rolo AP, Palmeira CM (2006). Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharm* 212:167-178.
- Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I (2005). Relationship of p22phox C242T polymorphism with nephropathy in type 2 diabetic patients. *J Nephrol* 18: 733-8.
- Schaffer SW, Jong CJ, Mozaffari M (2012). Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: Unifying hypothesis of diabetes revisited. *Vascul Pharmacol* 57:139-149.
- Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Tucunduva AC, Mill JG, Costa FO, Krieger JE, Franchini KG, Pereira AC, Nadruz W Jr (2012). CYBA C242T polymorphism is associated

- with obesity and diabetes mellitus in Brazilian hypertensive patients. *Diabet Med* 29:e55-61.
- Seghieri G, Di Simplicio P, De Giorgio L, Anichini R, Alberti L, Franconi F, (2000). Relationship between metabolic glycaemic control and platelet content of glutathione and its related enzymes, in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 299:109–117.
- Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P, Murphy TH (2005). Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem* 280:22925-22936.
- Shimo-Nakanishi Y, Hasebe T, Suzuki A, Mochizuki H, Nomiya T, Tanaka (2004). Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis* 175:109-115.
- Shimoyama Y, Mitsuda Y, Tsuruta Y, Hamajima N, Niwa T (2014). Polymorphism of Nrf2, an antioxidative gene, is associated with blood pressure and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Int J Med Sci* 11:726–731.
- Shin S, Wakabayashi J, Yates MS, Wakabayashi N, Dolan PM, Aja S, Liby KT, Sporn MB, Yamamoto M, Kensler TW (2009). Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-imidazolide. *Eur J Pharmacol* 620:138-144.
- Skrha J, Prázný M, Hilgertová J, Kvasnicka J, Kalousová M, Zima T (2007). Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol* 63:1107-1114.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 33:575-586.
- Soliman G (2008). Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Med J* 49:129–136.
- Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR (2000) . Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* Aug 321:405-412.
- Sumimoto H (2008). Structure, regulation and evolution of Nox family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 275:3249–3277.

- Sumimoto H, Miyano K, Takeya R (2005). Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun* 338:677-686.
- Sun Q, Yin Y, Zhu Z, Yan Z (2014). Association of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase P22 phox gene with type 2 diabetes mellitus risk: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin* 30:415-22.
- Surh YJ, Kundu JK, Na HK (2008). Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* 74:1526-1539.
- Sussan TE, Jun J, Thimmulappa R, Bedja D, Antero M, Gabrielson KL, Polotsky VY, Biswal S (2008). Disruption of Nrf2, a key inducer of antioxidant defenses, attenuates ApoE mediated atherosclerosis in mice. *PLoS One* 3: e3791.
- Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, Descatoire V, Cazanave S, Pessayre D, Degoul F (2005). The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 15:311-319.
- Sykiotis GP, Bohmann D (2008). Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 14:76-85.
- Tao L, Gao E, Jiao X, Yuan Y, Li S, Christopher TA, Lopez BL, Koch W, Chan L, Goldstein BJ, Ma XL (2007). Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress, *Circulation* 115:1408-1416.
- Thomas CC, Philipson LH (2015). Update on diabetes classification. *Med Clin North Am* 99:1-16.
- Tumova E, Sun W, Jones PH, Vrablik M, Ballantyne CM, Hoogeveen RC (2013). The impact of rapid weight loss on oxidative stress markers and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals. *J Obes* 2013:729515.
- Uchizono Y, Takeya R, Iwase M, Sasaki N, Oku M, Imoto H, Iida M, Sumimoto H (2006). Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci* 80:133-139.
- Urano A, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, Sugawara A, Kensler TW, Yamamoto M (2013). The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol Cell Biol* 33:2996-3010.

- Velmurugan GV, Sundaresan NR, Gupta MP, White C (2013). Defective Nrf2-dependent redox signalling contributes to microvascular dysfunction in type 2 diabetes. *Cardiovasc Res* 100:143-150.
- Wang L, Jia P, Wolfinger RD, Chen X, Zhao Z (2011). Gene set analysis of genome-wide association studies: methodological issues and perspectives. *Genomics* 98:1-8.
- Wang X, Chen HL, Liu JZ, Liao N, Yu WH, Zhang XD, Zhang T, Li WL, Hai CX (2013). Protective effect of oleanolic acid against beta cell dysfunction and mitochondrial apoptosis: crucial role of ERK-NRF2 signaling pathway. *J Biol Regul Homeost Agents* 27:55-67.
- WHO, World Health Organization: World Health Organization, International Diabetes Federation, editors (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation. Geneva (Switzerland).
- Wu K, McDonald P, Liu J, Klaassen C (2014). Screening of natural compounds as activators of the Keap1-Nrf2 pathway. *Planta Med* 80:97-104.
- Xaplanteris P, Vlachopoulos C, Baou K, Vassiliadou C, Dima I, Ioakeimidis N, Stefanadis C (2010). The effect of p22(phox) -930A/G, A640G and C242T polymorphisms of NADPH oxidase on peripheral and central pressures in healthy, normotensive individuals. *Hypertens Res* 33: 814-8.
- Xiang FL, Lu X, Strutt B, Hill DJ, Feng Q (2010). NOX2 deficiency protects against streptozotocin-induced beta-cell destruction and development of diabetes in mice. *Diabetes* 59:2603-2611.
- Xu C, Yuan X, Pan Z, Shen G, Kim JH, Yu S, Khor TO, Li W, Ma J, Kong AN (2006). Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol Cancer Ther* 5:1918-1926.
- Xu Z, Wei Y, Gong J, Cho H, Park JK, Sung ER, Huang H, Wu L, Eberhart C, Handa JT, Du Y, Kern TS, Thimmulappa R, Barber AJ, Biswal S, Duh EJ (2014). NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia*. 57:204-213.
- Xue M, Qian Q, Adaikalakoteswari A, Rabbani N, Babaei-Jadidi R, Thornalley PJ (2008). Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease. *Diabetes* 57:2809-2817.

- Xue P, Hou Y, Chen Y, Yang B, Fu J, Zheng H, Yarborough K, Woods CG, Liu D, Yamamoto M, Zhang Q, Andersen ME, Pi J (2013). Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome. *Diabetes* 62:845-854.
- Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, Kawamura H, Takahashi T, Pi J, Uruno A, Yamamoto M (2014). Nrf2 protects pancreatic  $\beta$ -cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes* 63:605-618.
- Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, Yamada A, Takeuchi M, Yamagishi S, Morito N, Nakano T, Ojima M, Shimohata H, Itoh K, Takahashi S, Yamamoto M (2008). Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes Cells* 13: 1159-1170.
- Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T (1995). Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 38:201-210.
- Yu Z, Shao W, Chiang Y, Foltz W, Zhang Z, Ling W, Fantus IG, Jin T (2011). Oltipraz upregulates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 [corrected](NRF2) antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetologia* 54:922-934.
- Zengi A, Ercan G, Caglayan O, Tamsel S, Karadeniz M, Simsir I, Harman E, Kahraman C, Orman M, Cetinkalp S, Ozgen G (2011). Increased oxidative DNA damage in lean normoglycemic offspring of type 2 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 119:467-471.
- Zhang X, Gregg EW, Williamson DF, Barker LE, Thomas W, Bullard KM, Imperatore G, Williams DE, Albright AL 2010. A1C level and future risk of diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 33:1665-1673.
- Zhao S, Li, Q, Liu, Z, Wang J, Wang X, Qin, M, Wen Q (2011). Curcumin attenuates insulin resistance in hepatocytes by inducing Nrf2 nuclear translocation. *Hepatogastroenterology* 58:2106

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento Informado

#### Carta de Consentimiento informado para participar en el estudio de investigación

**Título de los proyectos: Evaluación del factor de transcripción Nrf2 como posible blanco terapéutico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y su asociación con polimorfismos en la región promotora: primera etapa y Caracterización de la aldehído deshidrogenasa ALDH de eritrocitos humanos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.**

Dra. Eunice Rodríguez Arellano, Lab. Medicina Genómica HRLALM. Dr. José Pedraza Chaveri, Facultad de Química, UNAM. M. en C. Angélica Jiménez Osorio, UNAM, Dra. Diana Barrera Oviedo, Facultad de Medicina, UNAM, M en C. Alejandra Picazo Sansón.

Usted está siendo invitado a participar en un par de estudios de investigación científica interinstitucional con el objetivo de evaluar el papel de una molécula endógena y caracterizar enzimas antioxidantes como la ALDH de eritrocitos en pacientes con DM2 como posible marcador de estrés en el desarrollo de la diabetes a nivel molecular y genético. Por lo tanto, **su participación en estos estudios es completamente voluntaria**. Usted debe leer la siguiente información y sus dudas deben ser aclaradas por la persona que aplica este consentimiento, antes de decidir si desea participar o no.

**Propósito del estudio:** El objetivo es identificar si una molécula endógena (Nrf2) y algunas enzimas antioxidantes están involucradas en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones, así como saber si existe asociación entre los niveles de estas moléculas y la genética (polimorfismos). Como resultado de esta investigación se pretende establecer un biomarcadores de la enfermedad y estrategias de prevención y/o control de la enfermedad.

**Procedimiento:** Si decide ser voluntario su participación consistirá en lo siguiente.

Al aceptar participar en el estudio deberá llenar un cuestionario sobre su historial médico. El médico o enfermera le medirá la presión arterial, su peso y talla. Se le hará una toma de muestra de sangre que se obtiene de la vena del brazo de la misma manera para un análisis rutinario de sangre en un laboratorio clínico. Se requiere que usted tenga de 9 a 12 horas de ayuno. El volumen máximo de extracción será de 16 ml (2 tubos). Esta muestra servirá para los análisis de química sanguínea, biometría hemática y análisis químicos y moleculares necesarios para cumplir los objetivos de esta investigación. Además, se extraerá el ADN, que es aquella molécula que contiene los genes que heredamos de nuestros padres. Los datos clínicos y la muestra de ADN se identificarán con un código interno para proteger su privacidad. Sólo los investigadores involucrados en el estudio tendrán acceso a la información y ningún dato de identificación personal se vinculará con los datos clínicos para su privacidad.

**Riesgos potenciales y molestias:** La toma de muestra sanguínea le puede ser incómoda y en ocasiones puede resultar en un pequeño moretón en el sitio de punción. Su muestra de sangre y datos clínicos se etiquetarán con número de identificación interno para proteger sus datos personales dentro del marco de la ley.

**Beneficios potenciales:** en estudios de investigación no hay beneficios directos para los participantes. Los resultados derivados de este estudio no pueden ser interpretados de manera individual, sino a nivel poblacional. Por tanto, no recibirá ningún resultado molecular o genético de

manera individual. Debido a que se trata de una primera etapa, estos resultados servirán para establecer estrategias nuevas de control de la enfermedad y se divulgarán por medio de revistas científicas.

**Alternativas a la participación:** usted puede elegir participar o no en el estudio, en caso de retiro de la investigación, cerciórese que su cuestionario ha sido destruido así como su muestra desechada. No se afectará su relación con el HRLALM.

**Pago:** no hay ninguna retribución económica para los participantes en el estudio.

**Productos comerciales:** las muestras de sangre son importantes para el estudio y formarán parte de un repositorio único que permanecerá en resguardo de la institución. Si un producto comercial es desarrollado a partir de este proyecto, será propiedad de las instituciones y no del participante.

**Contribución financiera:** su participación no le generará costo.

**Compensación por daños relacionados a su participación:** en caso de que usted sufriera daño como resultado de su participación directa en el estudio, se le otorgará asistencia médica.

**Información:** usted podrá pedir información acerca del desarrollo del estudio al solicitarlo a la M. en C. Angélica Jiménez al tel. 5622 3878 o por vía electrónica al correo: dmnrf2\_hrlalm@gmail.com. Considere que la obtención de resultados finales puede tardar más de 2 años.

**Investigadores:**

Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano. Jefa de la unidad de Investigación, HRLALM.

Dr. José Pedraza Chaverri. Profesor investigador titular C de la Fac. de Química. UNAM.

M. en C. Angélica Saraí Jiménez Osorio. Candidata a Doctor. Fac. de Química. UNAM.

Dra. Diana Barrera Oviedo, Facultad de Medicina. Profesor investigador titular de la Fac. de Medicina. UNAM.

M en C. Alejandra Picazo Sansón. Candidata a Doctor. Fac. de Química. UNAM.

Yo, \_\_\_\_\_ he sido informado de los riesgos potenciales del estudio y declaro que es mi decisión participar en estos estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo retirarme de los estudios en el momento que así lo decida, sin penalización alguna y sin perder mis beneficios como derechohabiente. Si decido terminar mi participación, seguiré recibiendo atención médica en la unidad de adscripción que le corresponde y no se mostrará ningún prejuicio hacia mí para recibir atención médica o para participar en estudios de investigación futuros. Puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos potenciales o beneficios derivados de mi participación en este estudio. Puedo obtener los resultados de mi evaluación clínica si así los solicito. Puedo solicitar también información sobre las conclusiones generales del estudio, a través de contactar a la M. en C. Angélica Saraí Jiménez Osorio a M en c. Alejandra Picazo o la Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano al teléfono 53222300 Ext 89203.

He leído y entendido toda la información que me ha sido proporcionada acerca de mi participación en este estudio. Se me dio la oportunidad de preguntar todas mis dudas y estas han sido aclaradas a mi entera satisfacción. Entiendo y recibo una copia firmada de este consentimiento informado.

Nombre, fecha y firma del paciente \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la persona que aplicó este consentimiento \_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo 1 \_\_\_\_\_

Fecha de firma testigo 1 \_\_\_\_\_

Nombre y firma testigo 2 \_\_\_\_\_

Fecha de firma testigo 2 \_\_\_\_\_

### HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre	Edad	Fecha
Fecha de nacimiento	Clínica ISSSTE	
		Teléfono

#### Antecedentes Heredofamiliares

¿Sus familiares son mexicanos?	Si	No	Entidad federativa de procedencia
Padre			
Madre			
Abuelos paternos			
Abuelos maternos			

**¿Alguno de sus familiares padece (padeció) alguna de las siguientes enfermedades? (marca con una X en caso afirmativo)**

Familiar	Diabetes	Hipertensión	Infarto al corazón	Enf. Cerebrovascular	Nefropatías	Enf. neurodegenerativa
Abuelo Paterno						
Abuelo Materno						
Abuela Paterna						
Abuela Materna						
Padre						
Madre						
Hermanos						
Hijos						
Tíos directos						
Primos directos						

#### Antecedentes Personales (marque con una X según corresponda)

	si	no	
Consumo de tabaco			Cantidad
Consumo de alcohol			Cantidad
Tratamiento hormonal			
Pancreatitis			
Infarto			
Enfermedad vascular periférica			
Cirugías			Cual
Hipotiroidismo			
Acantosis Nigricans			
Ejercicio			Tiempo a la semana:
Hipertensión			Edad de diagnóstico: Tx:
Hipercolesterolemia (colesterol alto)			Edad de diagnóstico: Tx:
Hipertrigliceridemia (triglicéridos altos)			Edad de diagnóstico: Tx:
Consumo de alimentos antioxidantes			Cantidad
Consumo de suplementos para bajar de peso			Cantidad
Consumo de Complejo B y/o hierro.			Cantidad
Periodo normal de regla (Mujeres)			Fase:
Alguna otra enfermedad			Cual

#### Medidas antropométricas

Peso:	Talla:	Presión arterial	Cintura (cm):	Cadera (cm):	Brazo (cm):
-------	--------	------------------	---------------	--------------	-------------

**Diabetes: Si \_\_\_ No \_\_\_**

Edad de diagnóstico:	Glucosa promedio:	Tx:	Hospitalización: si ___ no ___
----------------------	-------------------	-----	--------------------------------

Complicaciones	Nefropatía: si <u>  </u> no <u>  </u>	Tx:	Edad de diagnóstico:
	Pie diabético: si <u>  </u> no <u>  </u>	Tx:	Edad de diagnóstico:
	Neuropatía: si <u>  </u> no <u>  </u>	Tx:	Edad de diagnóstico:
	Otra:	Tx:	Edad de diagnóstico:

### DIETA ALIMENTICIA

Nombre	Edad	Fecha
Fecha de nacimiento	Clínica ISSSTE	Teléfono

**¿Cuántos días a la semana consume los siguientes alimentos? Respuestas posibles:**

**Diario, 2 a 3 veces por semana, 4 a 6 veces por semana, Nunca**

<u>Alimento</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Alimento</u>	<u>Frecuencia</u>
Zarzamora		Aguacate	
Nuez		Almendra	
Fresa		Sandía	
Alcachofa		Granada roja	
Arándanos		Pescado	
Café		Apio	
Frambuesa		Arándano azul	
Mora azul		Té negro	
Vino tinto		Pimiento morrón amarillo	
Piña		Pimiento morrón verde	
Guayaba		Zanahoria	
Ciruela pasa		Betabel	
Col (repollo)		Acelgas	
Naranja		Verdolagas	
Manzana		Perejil	
Mango		Berros	
Ciruela negra		Mandarina	
Espinacas		Lima	
Cereales de grano			
Kiwi			
Papas			
Té verde			
Tamarindo			
Jitomate			
Pimiento morrón rojo			
Pimiento morrón naranja			

## Anexo 2: Características de los sujetos diabéticos

Característica	DM-NC	DM-C	P
Edad	56.3 (50-64)	57 (50-65)	0.467
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28.8 (26.4 - 31.2)	29.5 (26-32)	0.679
PAS (mmHg)	119 (110-130)	122 (113-130)	0.170
PAD (mmHg)	76 (70-80)	78 (70-85)	0.269
T-G (mg/dL)	244 (129-244)	193 (121-244)	0.671
C-T (mg/dL)	185 (151-207)	185 (148-220)	0.933
HDL (mg/dL)	44 (35-54)	43.5 (36-55)	0.914
LDL (mg/dL)	107 (71-127)	113.5 (86-131)	0.702
Urea (mg/dL)	37 (26.5-39)	42 (24-41.5)	0.838
Creatinina (mg/dL)	1.9 (0.6-0.95)	1.3 (0.7-0.9)	0.311
Ácido Úrico (mg/dL)	6 (4.5-6.5)	5.9 (5-7.1)	0.326
Tabaquismo n (%)	17 (19.54)	18 (18)	0.840
Tratamiento n (%)	81 (93)	83 (84)	0.072
Pancreatitis n (%)	3 (3.49)	6 (6.25)	0.306
Infarto al miocardio n (%)	3 (3.5)	8 (8.25)	0.149
Hipertensión diagnosticada n (%)	42(48.3)	50 (51)	0.709
Hipercolesterolemia n (%)	33(38)	33(34)	0.546
Hipertrigliceridemia n (%)	36 (41.4)	39 (40)	0.827
Nefropatía n (%)	4 (4.6)	8 (8.1)	0.250
Pie diabético n (%)	3 (3.45)	4 (4.08)	0.566
Neuropatía n (%)	5 (5.75)	9 (9.2)	0.275

Los datos se presentan como la media (rango intercuartílico). IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, HbA1c: hemoglobina glucosilada, T-G: triglicéridos, C-T: colesterol total, HDL-C: colesterol de alta densidad, LDL-C: colesterol de baja densidad. DM-NC: sujetos diabéticos con hemoglobina glucosilada  $\geq 7\%$  y DM-C: sujetos diabéticos con hemoglobina glucosilada  $< 7\%$ .

Article

## Nrf2 and Redox Status in Prediabetic and Diabetic Patients

Angélica S. Jiménez-Osorio <sup>1</sup>, Alejandra Picazo <sup>2</sup>, Susana González-Reyes <sup>1</sup>,  
Diana Barrera-Oviedo <sup>2</sup>, Martha E. Rodríguez-Arellano <sup>3</sup> and José Pedraza-Chaverri <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Chemistry, Department of Biology, National Autonomous University of Mexico (UNAM), University City 04510 DF, Mexico; E-Mails: joas17@hotmail.com (A.S.J.-O.); suxan05@gmail.com (S.G.-R.)

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, National Autonomous University of Mexico (UNAM), University City 04510 DF, Mexico; E-Mails: alepicazo1980@gmail.com (A.P.); dianabarrera@hotmail.com (D.B.-O.)

<sup>3</sup> Research Department, Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos”, ISSSTE, Av. Universidad 1321, Florida 01030 DF, Mexico; E-Mail: marthaeunicer@yahoo.com.mx

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: pedraza@unam.mx; Tel./Fax: +52-55-5622-3878.

External Editor: Lucia Ciccoli

Received: 22 October 2014, in revised form: 1 November 2014/ Accepted: 3 November 2014/

Published: 6 November 2014

---

**Abstract:** The redox status associated with nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) was evaluated in prediabetic and diabetic subjects. Total antioxidant status (TAS) in plasma and erythrocytes, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) content and activity of antioxidant enzymes were measured as redox status markers in 259 controls, 111 prediabetics and 186 diabetic type 2 subjects. Nrf2 was measured in nuclear extract fractions from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Nrf2 levels were lower in prediabetic and diabetic patients. TAS, GSH and activity of glutamate cysteine ligase were lower in diabetic subjects. An increase of MDA and superoxide dismutase activity was found in diabetic subjects. These results suggest that low levels of Nrf2 are involved in the development of oxidative stress and redox status disbalance in diabetic patients.

**Keywords:** Nrf2; prediabetes; diabetes; oxidative stress; glycated hemoglobin

---

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is an epidemic disease that is considered a health problem around the world. According to the International Diabetes Federation in 2013, 381 million people suffered from diabetes, and it is estimated that it will be almost double by 2030 [1]. Almost 6.4 million Mexican adults with diabetes were identified by the 2012 National survey, which represents about 9.2% of adults in Mexico with diabetes type 2 (DM2) [2,3]. DM2 diagnosis is based on fasting plasma glucose (FPG; >126 mg/dL or 7.0 mmol/L) and glycated hemoglobin (HbA1c; >6.5%). Furthermore the identification and diagnosis of prediabetic states (FPG: 100–125 mg/dL or 5.5–6.9 mmol/L; HbA1c: 5.7%–6.4%) [4] are crucial to understand the development of the disease.

DM is a multifactorial disease that includes genetic and environmental factors and the role of oxidative stress in this pathology was recognized two decades ago. Studies have shown that oxidative stress is associated with beta cell dysfunction [5] and the development of insulin resistance [6,7]. Diabetic patients from these studies showed a decrease in antioxidant levels, low activity of antioxidant enzymes, and an increase in both reactive oxygen species (ROS) production and oxidative stress markers. In addition, hyperglycemia can induce the overproduction of superoxide anions that affect several pathways that leads to diabetic complications [8,9]. Oxidative stress is often seen as an imbalance resulting from altered gene expression. The transcription factor called nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 or Nrf2 is referred to as the “master regulator” of the antioxidant response; it modulates the expression of a considerable number of genes, including not only those that control antioxidant enzymes, but also genes that control immune and inflammatory responses [10]. Under non-stress conditions, concentrations of Nrf2 are low, and the protein is retained in the cytoplasm owing to its association with Kelch-like ECH-associated inhibitor 1 (Keap1), also called Nrf2 inhibitor. In response to oxidative stress, a complex series of events leads to the stabilization of Nrf2 and its translocation into the nucleus [11], where it upregulates the expression of several genes whose promoter region contains an antioxidant response element (ARE) [12]. The relationship between Nrf2 and diabetes has been evaluated. In animal models, it has been shown that insulin signaling is necessary for Nrf2 activation [13]. When Nrf2 is activated, it protects  $\beta$ -cells from damage, and prevents the onset of diabetes [14,15], increasing insulin sensitivity [16,17], which can lead to a better glucose control [13,18] and prevention of the development of diabetic micro and macro vascular complications [19–22]. However, the way that Nrf2 exerts its anti-diabetic action is not fully understood at clinical level. Besides, by ethical constraints, it is inaccessible to use many methodologies in clinical trials. Thus, Nrf2 was measured in nuclear fractions of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from prediabetic and diabetic patients to establish the role of Nrf2 in diabetes. Total antioxidant status (TAS), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were measured as oxidative markers and the activity of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR),  $\gamma$ -glutamate cysteine ligase (GCL) and Cu-Zn-superoxide dismutase (SOD-1) were chosen to describe the redox status.

## 2. Results

### 2.1. Clinical and Anthropometrical Characteristics

A total of 559 subjects were involved in the study, with 260 control (CTRL), 116 prediabetic (PRE) and 183 DM2 subjects. Characteristics of clinical and anthropometrical values are shown in Table 1. There is an adverse lipid profile and presence of insulin resistance measured by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) since prediabetic status. Significant differences in the DM2 group were found in age, body mass index (BMI), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), glucose, HbA1c, triglycerides (TG) and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C). Therefore, these parameters are included in the multivariate analysis as possible potential confounders in the redox response. The population sample was representative of Mexico in overweight terms. In fact, the average of BMI is in obesity ranges in the prediabetic subjects and is lower in diabetic group (31.14 vs. 29.14 kg·m<sup>2</sup>). Systolic and diastolic pressures are altered in the DM2 group, with an increment of the average between 5.08% and 3.24%. From the CTRL group, 26.6% reported with diagnosed hypertension and 15.2% and 58.2% for PRE and DM2 subjects, respectively. As expected, fasting glycemia and HbA1c are altered in prediabetic and diabetic status (average increase of glucose: 15% for PRE and 41% for DM2, and for HbA1c: 22% for PRE and 30% for DM2, each vs. CTRL). TG levels increase during prediabetic status and are higher in diabetes. Of these prediabetic and diabetic subjects, 26.7% and 23%, respectively, reported being on treatment. HDL-C was found lower in PRE and DM2 subjects when compared with the CTRL group (9.8% and 13.7%, respectively lower than CTRL), no changes were observed in total cholesterol (T-C) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C).

**Table 1.** Clinical and anthropometrical characteristics of control (CTRL), prediabetic (PRE) and diabetes mellitus (DM2) individuals. Data are presented as mean (interquartile range). Statistical significance  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs. CTRL and <sup>b</sup> vs. PRE with a Wilcoxon rank-sum test.

Characteristics	CTRL $n = 260$	PRE $n = 116$	DM2 $n = 183$	$p$ Value
Age (years)	48.25 (41–52.5)	49.97 (43–54)	58.87 (50–64) <sup>a,b</sup>	<0.001
Male, $n$ (%)	127 (47.6)	47 (18.3)	87 (34)	0.4360
Female, $n$ (%)	138 (45.54)	69 (22.77)	96 (31.6)	-
BMI (kg·m <sup>-2</sup> )	27.7 (25.3–29.8)	31.37 (27.5–34.4) <sup>a</sup>	29.14 (26–31.4) <sup>a,b</sup>	<0.001
SBP (mmHg)	113.9 (110–120)	117.1 (110–120)	120.6 (110–130) <sup>a</sup>	<0.001
DBP (mmHg)	74.6 (70–80)	77.9 (70–80) <sup>a</sup>	77.5 (70–81) <sup>a</sup>	<0.001
Smoking, $n$ (%)	61 (23.6)	29 (25)	35 (19.1)	0.4050
Glucose (mg·dL <sup>-1</sup> )	91.1 (86–97)	106.8 (99–113) <sup>a</sup>	153.8 (108–169) <sup>a,b</sup>	<0.001
HbA1c (%)	4.6 (4.2–5.1)	5.9 (5.7–6.1) <sup>a</sup>	7.4 (5.8–8.4) <sup>a,b</sup>	<0.001
HOMA-IR	1.8 (1.3–2.3)	4.8 (3.2–5.9) <sup>a</sup>	-	<0.001
TG (mg·dL <sup>-1</sup> )	167.6 (106–210)	202 (130–242) <sup>a</sup>	214.2 (126–244) <sup>a</sup>	0.0059
T-C (mg·dL <sup>-1</sup> )	194.1 (167–217)	195.3 (168.5–218.5)	185.3 (150–212)	0.0910
HDL-C (mg·dL <sup>-1</sup> )	50.9 (43–58)	46.1 (39–53) <sup>a</sup>	43.7 (35–55) <sup>a</sup>	<0.001
LDL-C (mg·dL <sup>-1</sup> )	112.7 (94.5–132.5)	110.1 (90–130)	110.3 (84–129.5)	0.8800

BMI: Body mass index, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance, HbA1c: glycated hemoglobin, TG: triglycerides, T-C: total cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low density cholesterol.

## 2.2. Oxidative Markers

To evaluate the role of glucose control in oxidative stress, the DM2 group was divided in two groups according to the HbA1c levels. DM2-NC refers to diabetic patients without glucose control (HbA1c  $\geq 7\%$ ) and DM2-C which refers to diabetic patients with glucose control (HbA1c  $< 7\%$ ). The redox status was determined in prediabetic and diabetic individuals by measuring TAS in plasma and erythrocyte by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method (Figure 1a,b). The results showed no significant differences in oxidative markers in prediabetic individuals. TAS on plasma (DM2-NC:  $15.1\% \pm 5.8\%$  and DM2-C:  $17.4\% \pm 8\%$ ,  $p < 0.001$  compared vs. CTRL) and erythrocytes was decreased in diabetic individuals. DPPH was negatively associated with age, gender and HbA1c in plasma and just with age and HbA1c in erythrocytes (Table 2). Moreover, MDA was found higher in DM2-NC compared vs. CTRL ( $\mu\text{M}$  MDA,  $p < 0.001$ ) but there was a lower concentration in DM2-C group compared with DM2-NC ( $3.07 \pm 1.5$  vs.  $3.5 \pm 1.5$   $p: 0.032$ ) (Figure 1d). In fact, multiple regression showed that MDA is associated with BMI and HbA1c levels (Table 2). GSH concentrations were lower in DM2 subjects, but the DM2-C group had higher concentrations of total GSH and reduced form vs. CTRL and DM2-C group. GSH was associated negatively with age and HbA1c (Table 2). No significant differences were found in glutathione disulfide GSSG and GSH/GSSG ratio.

**Figure 1.** Oxidative markers in the studied groups. (a) Total antioxidant status (TAS) expressed as % of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging in plasma and (b) erythrocytes; (c) malondialdehyde (MDA) levels in plasma; (d) total glutathione (GSH) and (e) reduced form of GSH concentrations in plasma. CTRL: control, PRE: prediabetes, DM2-NC: diabetic subjects without glycemic control (glycated hemoglobin  $\geq 7\%$ ), DM2-C: diabetic subjects under glycemic control (glycated hemoglobin  $< 7\%$ ). Each bar represents mean  $\pm$  S.E. Statistical significance  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs. CTRL and <sup>b</sup> vs. PRE <sup>c</sup> vs. DM2-C with a Wilcoxon rank-sum test.

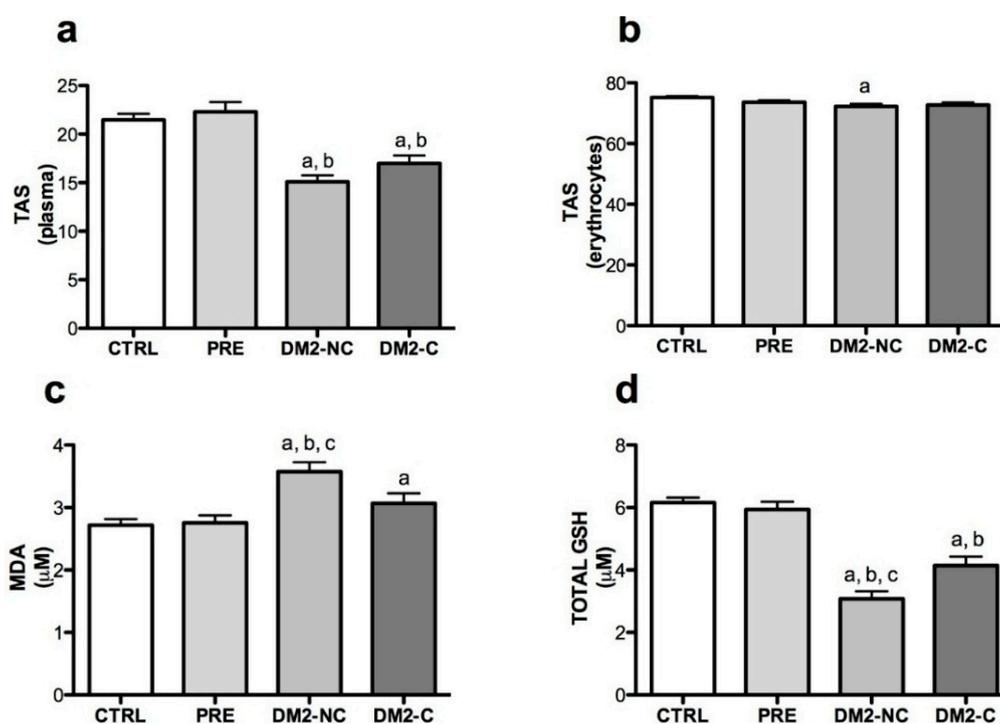
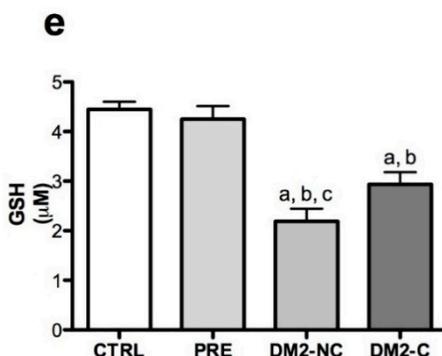


Figure 1. Cont.



**Table 2.** Associations of significant redox status markers and antioxidant activities with age, gender, BMI, glucose and HbA1c in diabetic subjects. Multiple linear regressions in diabetic group and controls. Results are  $\beta$ , 95% CI,  $p$  of each regressor variable and  $R^2$  of each model including plasma TAS, erythrocyte DPPH, MDA, GSH and SOD activity as dependent variables.

Variables		Age	Gender	BMI	Glucose	HbA1c
Plasma TAS	$\beta$	-0.21	-2.28	0.012	-0.019	-0.98
	95% CI	-0.28 to -0.13	-3.82 to -0.19	-0.16 to 0.18	-0.037 to 0.076	-1.7 to -0.2
	$p$	<0.001	0.004	0.894	0.511	0.014
	$R^2$	0.190	-	-	-	-
Erythrocyte TAS	$\beta$	-0.26	-1.59	0.086	-0.012	-1.2
	95% CI	-0.36 to -0.17	-3.40 to 0.20	-0.11 to 0.29	-0.015 to 0.040	-1.95 to -0.44
	$p$	<0.001	0.084	0.411	0.381	0.002
	$R^2$	0.221	-	-	-	-
MDA	$\beta$	0.006	-0.14	0.04	-0.019	0.17
	95% CI	-0.01 to 0.23	-0.43 to 0.15	0.004 to 0.074	-0.004 to 0.003	0.06 to 0.28
	$p$	0.45	0.34	0.026	0.941	0.003
	$R^2$	0.08	-	-	-	-
GSH	$\beta$	-0.074	-0.46	0.04	0.002	-0.25
	95% CI	-0.1 to -0.04	-1.01 to 0.08	-0.02 to 0.11	-0.0007 to 0.004	-0.45 to -0.055
	$p$	<0.001	0.097	0.19	0.159	0.013
	$R^2$	0.13	-	-	-	-
SOD-1	$\beta$	0.29	7.04	0.052	-0.005	2.99
	95% CI	0.06 to 0.51	3.1 to 10.9	-0.42 to 0.53	-0.07 to 0.06	1.14 to 4.84
	$p$	0.011	<0.001	0.831	0.89	0.002
	$R^2$	0.124	-	-	-	-

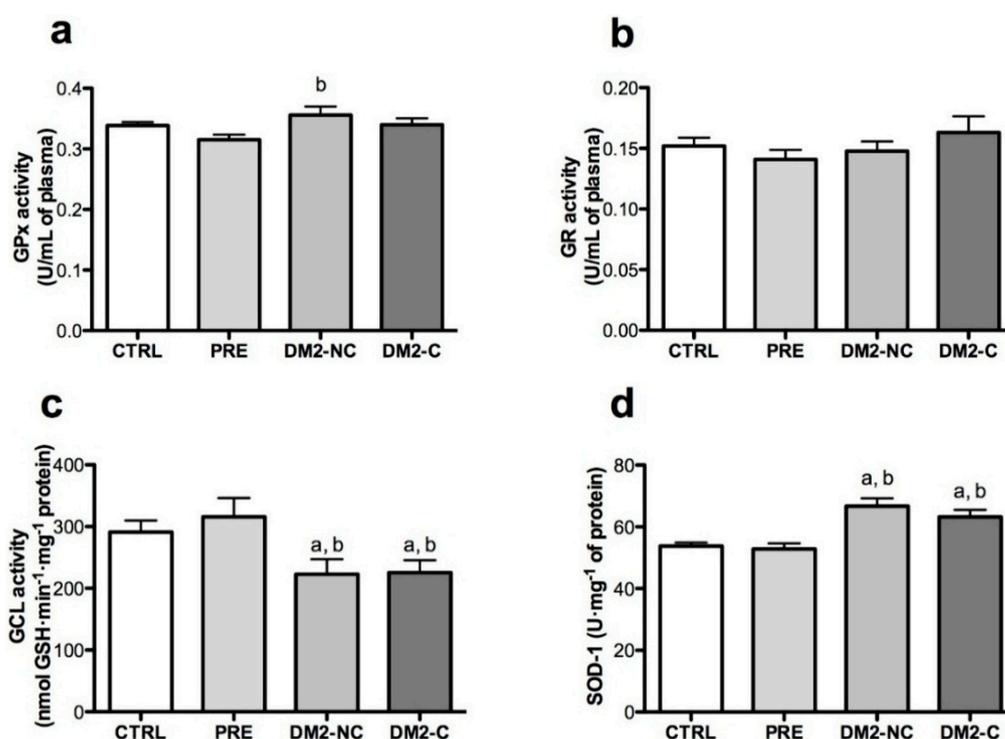
Gender: 0 males, 1 females, BMI: body mass index, HbA1c: glycated hemoglobin, MDA: malondialdehyde, GSH: glutathione, SOD-1: Cu-Zn superoxide dismutase activity.

### 2.3. Activities of Antioxidant Enzymes

Activities of GPx and GR in plasma were not different in the studied groups when compared with CTRL group (Figure 2a,b). There is a trend of GPx to decrease in PRE group vs. DM2-NC, but not vs. CTRL group. There was a decrease in GCL activity in DM2-NC compared with CTRL and PRE

groups (Figure 2c). The activity of GCL was adjusted by age, gender, BMI, glucose and HbA1c levels, but there was no association. SOD-1 activity was higher in DM2-NC and DM2-C when compared with CTRL group SOD-1 was associated positively with age, gender and HbA1c (Table 2).

**Figure 2.** Activity of antioxidant enzymes. Plasma activity of (a) Glutathione peroxidase (GPx) and (b) Glutathione reductase (GR) and (c)  $\gamma$ -Glutamate cysteine ligase (GCL) and (d) Cu-Zn-superoxide dismutase (SOD) activities in erythrocytes hemolysates. CTRL: control, PRE: prediabetes, DM2-NC: diabetic subjects without glycemic control (glycated hemoglobin  $\geq 7\%$ ), DM2-C: diabetic subjects under glycemic control (glycated hemoglobin  $< 7\%$ ). Each bar represents mean  $\pm$  S.E. Statistical significance  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> vs. CTRL and <sup>b</sup> vs. PRE with a Wilcoxon rank-sum test.

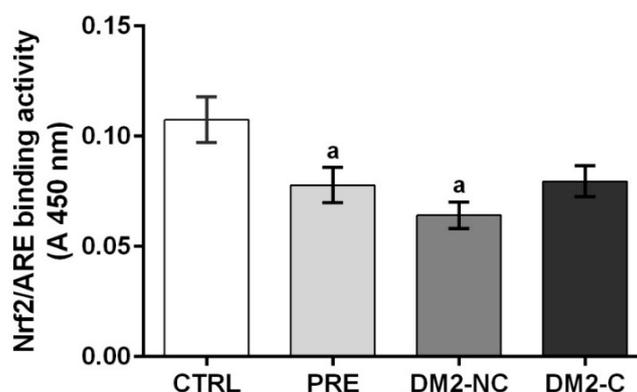


#### 2.4. Nrf2/ARE Binding Activity Assay

To determine if prediabetic and diabetic status is associated with activation of Nrf2, nuclear fractions were isolated from PBMC of a representative sample of each group (100 CTRL, 68 PRE, 54 DM2-NC and 58 DM2-C). Nrf2 binding activity is decreased in PRE and DM2-NC compared with CTRL (22% and 40% of decrease vs. CTRL) (Figure 3). DM2-C tends to decrease (compared vs. CTRL and to increase compared vs. DM2-NC) but these differences were not significant. A regression model was applied to explain the effect of variables such as BMI, age, gender, glucose and HbA1c in prediabetic subjects and controls, however Nrf2 levels were not associated with these variables. However, there was an independent association with plasma TAS and GPx (TAS:  $\beta$ :  $-0.001$ ,  $p$ : 0.047,  $R^2$ : 0.024; GPx:  $\beta$ : 0.2,  $p$ : 0.008,  $R^2$ : 0.05), but these associations explain less than 10% of Nrf2 variability. To explain Nrf2 variability in DM2 patients a linear regression model was made. The Nrf2 levels were transformed to logarithm scale to achieve a good fit and to avoid heteroscedasticity. The model includes glucose, HbA1c, age, gender, BMI, hospitalization by hypoglycemic events (0 = no,

1 = yes) and interaction of TAS with GSH levels. Systolic and diastolic pressure, as well as TG levels were not significantly associated in regression models and they were not included in the model. To perform this analysis, the groups of diabetics were categorized by glycemic control (DM2-C) and without control (DM2-NC) as dummy variables compared with CTRL group. HbA1c, age, hospitalization by hypoglycemic events (0 = no, 1 = yes) and interaction of TAS with GSH levels showed significant associations (Table 3).

**Figure 3.** Nrf2/ARE binding activity assay: Nuclear proteins from CTRL: control subjects ( $n = 100$ ), PRE: prediabetic subjects ( $n = 68$ ), DM2-NC: diabetic subjects without glycemic control ( $Hb > 7.0\%$ ,  $n = 54$ ), DM2-C: diabetic subjects with glycemic control ( $n = 58$ ) were incubated with the oligonucleotide for ARE (antioxidant response element). Each bar represents mean  $\pm$  S.E. <sup>a</sup> Significant difference vs. CTRL with  $p < 0.05$ .



**Table 3.** Associations of Nrf2 levels with HbA1c, age, hospitalization, diabetic groups and oxidative stress. Multiple linear regression including diabetic and control group. Results are shown as  $\beta \pm$  S.E. of  $\beta$ ,  $p$  of each regressor variable and  $R^2$  of the model including. Nrf2 data were transformed to log scale to avoid heteroscedasticity. HbA1c: glycated hemoglobin, Hospitalization: hospitalization by hypoglycemic events, 0 = no, 1 = yes, DM2-NC and DM2-C dummy variable for groups where DM2-NC include diabetic subjects without glycemic control and DM2-C include diabetic subjects with glycemic control, TAS \* GSH: interaction of total antioxidant status (plasma DPPH) and reduced glutathione.

Variables	$\beta \pm$ S.E. of $\beta$	$p$	$R^2$
HbA1c	-0.097 $\pm$ 0.04	0.042	0.194
Age	-0.011 $\pm$ 0.005	0.045	-
Hospitalization	0.48 $\pm$ 0.19	0.013	-
DM2-NC	-1.06 $\pm$ 0.23	<0.001	-
DM2-C	-0.48 $\pm$ 0.14	0.001	-
TAS * GSH	-0.008 $\pm$ 0.0004	0.044	-

### 3. Discussion

DM is an important area of investigation worldwide and represents an important disease with an increase of morbidity and mortality. Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of diabetic complications when glucose levels are not controlled. Since the protective role of Nrf2 in

diabetes and its complications in rat models has been known, its activation has been suggested for the control of diabetes and oxidative stress induced by hyperglycemia. There are no clinical researches about the role of Nrf2 in diabetic patients.

The levels of different oxidative stress markers in plasma and erythrocytes from prediabetic and diabetic individuals were measured in the present study. Initially, our population sample was representative from Mexico in terms of BMI, because 70% of the Mexican population suffers from overweight and obesity [3]. Patients over 70 years old without diabetes are not common patients in Family Medical Clinics. Therefore, we adjusted each variable of oxidative stress with age, gender, BMI, glucose and HbA1c levels. Consistent with previous findings it was found that TAS, total GSH and reduced GSH are diminished in diabetic status, but this trend in the prediabetic group was not found. There are few clinical studies about redox status in prediabetic patients and results are controversial. Dziegielewska-Gęsiak *et al.* [23] found diminished plasma TAS (measure by the 2,2'-azobis-3-ethylbenthiiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method) and an increment of MDA levels in 28 elderly prediabetic subjects. However, Al-Aubaidy and Jelinek [24] and Zengi *et al.* [25] did not find changes in GSH and lipid peroxidation in prediabetic subjects but they found an increased level of 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine (8-OHdG), suggesting that DNA damage during prediabetes may occur before lipid peroxidation or decreased antioxidant defenses, that is observed during diabetes. These differences are probably due to the sample size and genetic factors that predispose to changes in oxidative stress during prediabetes.

A decrease in GSH levels in diabetes was reported in previous studies [26–28]. Total GSH and GSH levels were found decreased in the diabetic population, but the GSH/GSSG ratio was not significantly affected in the studied groups. This may be due to the fact that GPx and GR activities were not modified in any group. In addition, GCL, the enzyme that catalyzes the rate-limiting step in GSH biosynthesis [29], was significantly lower in DM2-NC subjects compared with the CTRL group. These data suggest that decreased GSH levels may be secondary to GCL activity and not by its recycling. When diabetic subjects are in glycemic control, measure by HbA1c (<7%) as indicated by the American Diabetes Association (ADA) [4], GSH levels were not strongly decreased. These results agree with Kulkarni *et al.* [30] and Pavlović *et al.* [31]; they found that GSH levels increased by treatment with sulfonylureas and biguanides. In fact, new studies focus on the use of GSH as a marker of glycemic control [30].

TAS reflects both exogenous and endogenous antioxidants in plasma. Due to the major antioxidant, GSH decreases and lipid peroxidation products measured as MDA increases, lead to diminished TAS in DM2 in plasma and erythrocytes. Oxidative stress is more evident in diabetes status than prediabetes. Recent reports suggest that oxidative damage, despite the increase in the activity of SOD [32,33] by a possible adaptive response due to ROS, is generated during diabetes. Our results agree with this hypothesis, but this point is very controversial. Other reports indicate that SOD is diminished in diabetic patients [34]. It has been suggested that the mechanism by which this occurs requires higher activity of catalase and GPx. Plasma GPx tends to be higher in the DM2-NC group, but differences were not significant and this investigation did not include catalase activity; thus further analysis is needed to elucidate this point. Another explanation may involve genetic factors that could alter the functionality and activity of these enzymes according to populations.

Our results are consistent with previous reports showing oxidative stress in diabetic patients, a novel role of Nrf2 from PBMC associated with HbA1c levels was found in this study. It is recognized that oxidative stress, inflammation and insulin resistance have a close relationship with Nrf2 in animal models. This factor up regulates the expression of enzymes that maintain cellular redox homeostasis including heme oxygenase 1 (HO-1), GPx, glutathione *S*-transferase A1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 and GCL. In animal models, Nrf2 agonists improve insulin resistance and obesity in adipose tissue and prevent apoptosis in  $\beta$ -cells [16,17,21,35]. Nevertheless, it is not clear which tissue exerts the principal action against insulin resistance and the development of diabetes. In this study, we found lower Nrf2 activity since prediabetes, but the variables included in this study were not enough to explain Nrf2 variability during prediabetes. We just find a weak association of TAS and GPx with Nrf2, but these associations do not explain more than 5% of the Nrf2 variability during prediabetes. We speculate that the ranks of HbA1c levels need to be much closer to find a strong association with Nrf2 between PRE and CTRL groups. Also, it is known that Nrf2 is regulated by dietary compounds [36,37], but exogenous antioxidant consumption was not controlled in this study. A trial has been published on prediabetic subjects, who were randomly assigned to receive either curcumin, an activator of Nrf2, or a placebo for nine months to prevent diabetes development [38]. They found an improvement of overall function of  $\beta$ -cells and a diminution in the number of prediabetic individuals who eventually developed T2DM was lower. We propose that the effect of dietary compounds in Nrf2 and prediabetes maybe be a topic for future research.

A significant decrease was found of Nrf2 in DM2-NC patients. It would be expected that oxidative stress in these diabetic patients would enhance Nrf2 levels. Therefore, these findings suggest that the Nrf2 response in these patents is impaired. The regression analysis suggest that the lack of Nrf2 induction may be explained, at least in part, by the increase of HbA1c levels, by the age and by the diminution in TAS and GSH. However, these variables just explain 19% of the variability of the levels in our population sample. Lower levels of Nrf2 in individuals with poor glucose control were found. So far a mechanism by which hyperglycemia causes a decrease in the activation of Nrf2 is unknown in peripheral blood mononuclear cells. Some studies in podocytes and cardiomyocytes incubated with high glucose concentrations show that Nrf2 transcript is increased [18,39]. In contrast, in animals with chronic renal failure it was found that oxidative stress and inflammation in the kidney are compounded by conspicuous impairment of Nrf2 activation and consequent downregulation of the antioxidant enzymes [40]. However, we assume that most severe hyperglycemic states have a longer negative effect on the induction of Nrf2 by yet unknown mechanisms, coupled with an inflammatory condition that may influence the activation of Nrf2. On the other hand, single nucleotide polymorphism (SNP) of the promoter region of Nrf2 is associated with the development of different diseases that have in common the presence of oxidative stress [41–44], but so far there are no records of its association with diabetes. We suggest that SNP may be a factor that modulates the response of Nrf2 in our populations. Finally, our study has some limitations. First, mRNA levels of Nrf2-dependent enzymes and other parameters such as inflammation markers, known to be involved in Nrf2 regulation, were not measured in these patients. However, our results suggest that Nrf2 can be a target to attenuate diabetic complications induced by oxidative stress starting after the prediabetes state.

## 4. Experimental Section

### 4.1. Study Design and Subjects

The present study was conducted according to the Declaration of Helsinki. The project was approved by the Research, Ethics and Biosafety Committee of the Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos (registration number 253.2013). Subjects were recruited from Family Medical Clinics of the Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) in the south of Mexico city. A total of 559 Mexican individuals older than 35 years old were included. According to their FPG and HbA1c levels, individuals were classified into three groups. Normoglycemic subjects (FPG < 100 mg/dL and HbA1c < 5.7%) were referred to as Control (CTRL) group ( $n = 259$ ). PRE group included subjects whose FPG values were of 100–125 mg/dL and HbA1c 5.7%–6.4%, known as pre-diabetic subjects. The third group consisted of previously diagnosed diabetic subjects with or without medical supervision, with over five years of disease evolution (DM2). Patients with other types of DM, alcoholic subjects, pregnant women, persons with clotting disorder and erythrocythemia were excluded. All participants gave informed consent and completed a questionnaire comprising hereditary diseases and medical history.

### 4.2. Sample Collection and Biochemical Analysis

Three samples (each of 6 mL) of venous peripheral blood were obtained from the antecubital vein after 8–10 h of night time fasting. One sample was collected into a serum separator tube and was centrifuged at  $1500\times g$  for 10 min at 4 °C. Fasting glucose levels and lipid status parameters such as T-C, LDL-C, HDL-C and TG concentrations were measured in serum using a Miura 200 autoanalyzer employing commercial kits (I.S.E., Rome, Italy). One ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) sample tube was used for blood collection. Ten  $\mu\text{L}$  of EDTA-blood were used for HbA1c quantification in a Miura 200 autoanalyzer and the remnant was used for plasma and erythrocytes isolation by centrifugation ( $1500\times g$  for 10 min at 4 °C). The second blood EDTA tube was used for the PBMC isolation. Plasma was used to measure TAS, MDA and GSH and activity of GPx and GR. Erythrocytes were washed with cold 0.9% saline solution twice and hemolysates with double distilled (dd) H<sub>2</sub>O (1:5) and centrifuged at  $1500\times g$  for 10 min at 4 °C. Lysates from erythrocytes were used for GCL and SOD-1 activity assays.

### 4.3. PBMC and Nuclear Extract Isolations

PBMC isolation was performed on a representative sample of each group (100 CTRL, 68 PRE, 112 DM2), using a commercial kit (Lymphoprep™) from Axis-Shield (Oslo, Norway) and the procedure was conducted according to the manufacturer's instructions. Immediately, the nuclear fraction was isolated using Nuclear Extract commercial Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). The nuclear fractions were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the Nrf2 determinations were performed.

#### 4.4. Redox Status Markers

DPPH, MDA, GSH, GPx, GR and SOD-1 were measured spectrophotometrically by colorimetric assays. GCL was measured fluorophotometrically using the corresponding fluorophore. Each assay was carried out in a Multi-Mode Reader Synergy HT (Biotek, Winooski, VA, USA).

##### 4.4.1. Total Antioxidant Status (TAS)

This was measured using DPPH as previously described by Koren *et al.* [45]. The antioxidant potencies of plasma and washed erythrocytes reduce the DPPH to the yellow-colored dyphenylpicryl-hydrazine. The adduct absorbance was measured at 518 nm and the results were expressed as percentage of DPPH inhibition.

##### 4.4.2. MDA and GSH Content in Plasma

MDA concentration was measured in plasma using a standard curve of 1,1,3,3-tetramethoxypropane [46]. Total glutathione (GSH + GSSG) levels were measured in plasma using the GR enzyme method. This assay is based on the reaction of GSH which produces 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) from 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB), detectable at 412 nm. The procedure was carried out as previously reported [47].

##### 4.4.3. Activity of Antioxidant Enzymes in Plasma

The activity of GPx was measured using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate and GR activity was determined using GSSG as substrate and both by measuring the disappearance of NADPH at 340 nm each minute for 3 min. One unit of GPx or GR is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 μmol of NADPH/min. The activities of both enzymes were expressed as U/mL of plasma.

##### 4.4.4. Activity of Antioxidant Enzymes in Erythrocyte

SOD-1 activity was measured using xanthine-xanthine oxidase for generation of superoxide anion and nitroblue-tetrazolium (NBT) as indicator reagent that is reduced to formazan detectable at 586 nm. One unit of SOD-1 is defined as the amount of protein that inhibits NBT reduction by 50%. γ-GCL activity was determined according to White *et al.* [48]. When glutamate and cysteine were added to the reaction mixture, the formation of fluorescent adducts of the compound 2,3-naphthalene dicarboxaldehyde (NDA), was measured. The fluorescence was determined using an excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively. Results were expressed as nmol GSH synthesized above basal/min/mg erythrocyte protein.

#### 4.5. Nrf2 Binding Activity Assay

Protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay Dye from Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). A commercial kit (TransAm<sup>®</sup> Nrf2, Active-Motif., Carlsbad, CA, USA) was used for the binding activity assay of Nrf2. This kit contains an immobilized oligonucleotide containing the ARE consensus-binding site (5'-GTCACAGTGA CT CAGCAGAATCTG-3'). The active

form of Nrf2 contained in the nuclear extract specifically binds to this oligonucleotide. Twenty  $\mu\text{g}$  of nuclear extract was allowed to bind to the ARE on 96-well plates. A primary antibody was used to detect Nrf2, which recognizes an epitope on Nrf2 protein upon DNA binding. A horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody was added to provide a sensitive colorimetric readout at 450 nm. Nuclear extracts from COS-7 cells transfected with Nrf2 were used as positive control.

#### 4.6. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using STATA 12 (StataCorp, College Station, TX, USA). The Gaussian distribution was tested by the Shapiro-Wilk test. Analysis of variance was used to compare CTRL, PRE and DM2 subjects followed by a *post hoc* analysis (Bonferroni). A nonparametric Kruskal-Wallis test was used to evaluate variables with a non-Gaussian distribution. For evenly distributed outcomes, values were described as mean and with standard error, otherwise outcomes, were expressed as median and interquartile ranges (with presentation of 1st and 3rd quartile). Linear multiple regressions were used to estimate the relationship between redox markers or Nrf2 activity and clinical or anthropometric parameters. Graphics were made using GraphPad Prism software v. 6.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, USA). A  $p < 0.05$  was considered significant.

### 5. Conclusions

Nrf2 was diminished during prediabetic and diabetic states and oxidative stress was elevated in diabetes. Thus, these data suggest that Nrf2 decrease could precede the onset of oxidative stress during diabetes and could be a target for treatment of diabetes and its complications by improving redox status.

### Acknowledgments

This work was supported by CONACYT (SALUD 2013-201519). Authors thank all patients for the study and the next medico-familiar clinics of the ISSSTE zona sur: Fuentes Brotantes, Del Valle, Ignacio Chávez and Xochimilco. They also thank Adriana Monroy Guzmán for contributing to the recruitment of prediabetic patients.

### Author Contributions

Angélica S. Jiménez-Osorio, Alejandra Picazo and Susana González-Reyes performed the experiments; José Pedraza-Chaverri and Diana Barrera-Oviedo designed the study and experiments. Martha E. Rodríguez-Arellano was involved in patients' recruitment. Angélica S. Jiménez-Osorio and José Pedraza-Chaverri analyzed the data and wrote the manuscript.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Chen, L.; Magliano, D.J.; Zimmet, P. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2012**, *8*, 228–236.
2. Arredondo, A.; de Icaza, E. The cost of diabetes in Latin America: Evidence from Mexico. *Value Health* **2011**, *14*, S85–S88.
3. National Institute of Public Health. National Health and Nutrition Survey-2010. Damages and Health Services, Cuernavaca, M.I.S. Available online: <http://consulta.mx/web/index.php/estudios-e-investigaciones/otros-estudios/502-encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-2012-ensanut> (accessed on 8 August 2014).
4. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 14–80.
5. Weyer, C.; Bogardus, C.; Mott, D.; Pratley, R. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Investig.* **1999**, *104*, 787–794.
6. Kaneto, H.; Katakami, N.; Kawamori, D.; Miyatsuka, T.; Sakamoto, K.; Matsuoka, T.A.; Matsuhisa, M.; Yamasaki, Y. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 355–366.
7. Newsholme, P.; Haber, E.P.; Hirabara, S.M.; Rebelato, E.L.; Procopio, J.; Morgan, D.; Oliveira-Emilio, H.C.; Carpinelli, A.R.; Curi, R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: Role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J. Physiol.* **2007**, *583*, 9–24.
8. Perner, A.; Nielsen, S.; Rask-Madsen, J. High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensiv. Care Med.* **2003**, *29*, 642–645.
9. Wolff, S.; Dean, R. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of “autoxidative glycosylation” in diabetes. *Biochem. J.* **1987**, *245*, 243–250.
10. Hybertson, B.; Gao, B.; Bose, S.; McCord, J. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol. Aspects Med.* **2011**, *32*, 234–246.
11. Kodiha, M.; Stochaj, U. Nuclear transport: A switch for the oxidative stress-signaling circuit? *J. Signal Transduct.* **2012**, *2012*, doi:10.1155/2012/208650.
12. Magesh, S.; Chen, Y.; Hu, L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 687–726.
13. Xue, M.; Qian, Q.; Adaikalakoteswari, A.; Rabbani, N.; Babaei-Jadidi, R.; Thornalley, P. Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease. *Diabetes* **2008**, *57*, 2809–2817.
14. Lee, S.; Hur, E.; Ryoo, I.; Jung, K.; Kwak, J.; Kwak, M. Involvement of the Nrf2-proteasome pathway in the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *264*, 431–438.
15. Yagishita, Y.; Fukutomi, T.; Sugawara, A.; Kawamura, H.; Takahashi, T.; Pi, J.; Uruno, A.; Yamamoto, M. Nrf2 protects pancreatic beta-cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes* **2014**, *63*, 605–618.

16. Yu, Z.; Shao, W.; Chiang, Y.; Foltz, W.; Zhang, Z.; Ling, W.; Fantus, I.G.; Jin, T. Oltipraz upregulates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 [corrected] (NRF2) antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetologia* **2011**, *54*, 922–934.
17. Zhao, S.; Li, Q.; Liu, Z.; Wang, J.; Wang, X.; Qin, M.; Wen, Q. Curcumin attenuates insulin resistance in hepatocytes by inducing Nrf2 nuclear translocation. *Hepatogastroenterology* **2011**, *58*, 2106–2111.
18. He, X.; Kan, H.; Cai, L.; Ma, Q. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**, *46*, 47–58.
19. Yoh, K.; Hirayama, A.; Ishizaki, K.; Yamada, A.; Takeuchi, M.; Yamagishi, S.; Morito, N.; Nakano, T.; Ojima, M.; Shimohata, H.; Itoh, K.; Takahashi, S.; Yamamoto, M. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes Cells* **2008**, *13*, 1159–1170.
20. Negi, G.; Kumar, A.; Joshi, R.P.; Sharma, S.S. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: Old perspective with a new angle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *408*, 1–5.
21. Palsamy, P.; Subramanian, S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *BBA Mol. Basis Dis.* **2011**, *1812*, 719–731.
22. Pergola, P.; Raskin, P.; Toto, R.D.; Meyer, C.J.; Huff, J.W.; Grossman, E.B.; Krauth, M.; Ruiz, S.; Audhya, P.; Christ-Schmidt, H.; *et al.* BEAM Study Investigators. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 327–333.
23. Dziegielewska-Gesiak, S.; Wysocka, E.; Michalak, S.; Nowakowska-Zajdel, E.; Kokot, T.; Muc-Wierzoń, M. Role of lipid peroxidation products, plasma total antioxidant status, and Cu-, Zn-superoxide dismutase activity as biomarkers of oxidative stress in elderly prediabetics. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/987303.
24. Al-Aubaidy, H.; Jelinek, H. 8-Hydroxy-2-deoxy-guanosine identifies oxidative DNA damage in a rural prediabetes cohort. *Redox Rep.* **2010**, *15*, 155–160.
25. Zengi, A.; Ercan, G.; Caglayan, O.; Tamsel, S.; Karadeniz, M.; Simsir, I.; Harman, E.; Kahraman, C.; Orman, M.; Cetinkalp, S.; *et al.* Increased oxidative DNA damage in lean normoglycemic offspring of type 2 diabetic patients. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2011**, *119*, 467–471.
26. Yoshida, K.; Hirokawa, J.; Tagami, S.; Kawakami, Y.; Urata, Y.; Kondo, T. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: Regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* **1995**, *38*, 201–210.
27. Seghieri, G.; di Simplicio, P.; de Giorgio, L.; Anichini, R.; Alberti, L.; Franconi, F. Relationship between metabolic glycaemic control and platelet content of glutathione and its related enzymes, in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *299*, 109–117.
28. Kalkan, H.; Suher, M. The relationship between the level of glutathione, impairment of glucose metabolism and complications of diabetes mellitus. *Pak. J. Med. Sci.* **2013**, *29*, 938–942.
29. Franklin, C.; Backos, D.; Mohar, I.; White, C.; Forman, H.; Kavanagh, T. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 86–98.

30. Kulkarni, R.; Acharya, J.; Ghaskadbi, S.; Goel, P. Thresholds of oxidative stress in newly diagnosed diabetic patients on intensive glucose-control therapy. *PLoS One* **2014**, *9*, e100897.
31. Pavlovic, D.; Kocić, R.; Kocić, G.; Jevtović, T.; Radenković, S.; Mikić, D. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2000**, *2*, 251–256.
32. Bandeira, S.M.; Glaucivane, S.G; Fonseca, L.J; Pires, A.; Gelain, D.P.; Moreira, J.C.; Rabelo, L.A.; Vasconcelos, S.M.; Goulart, M.O. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: Increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2012**, doi:10.1155/2012/819310.
33. Aouacheri, O.; Saka, S.; Krim, M.; Messaadia, A.; Maida, I. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Can. J. Diabetes* **2014**, doi:10.1016/j.jcjd.2014.03.002.
34. Soliman, G. Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Med. J.* **2008**, *49*, 129–136.
35. Bhakkiyalakshmi, E.; Shalini, D.; Sekar, T.; Rajaguru, P.; Paulmurugan, R.; Ramkumar, K. Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 1747–1757.
36. Cardozo, L.F.; Pedruzzi, L.M.; Stenvinkel, P.; Stockler-Pinto, M.B.; Daleprane, J.B.; Leite, M., Jr.; Mafra, D. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie* **2013**, *95*, 1525–1533.
37. Wu, K.; McDonald, P.; Liu, J.; Klaassen, C. Screening of natural compounds as activators of the keap1-nrf2 pathway. *Planta Med.* **2014**, *80*, 97–104.
38. Chuengsamarn, S.; Rattanamongkolgul, S.; Luechapudiporn, R.; Phisalaphong, C.; Jirawatnotai, S. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 2121–2127.
39. Wang, C.; Li, C.; Peng, H.; Ye, Z.; Zhang, J.; Liu, X.; Lou, T. Activation of the Nrf2-ARE pathway attenuates hyperglycemia-mediated injuries in mouse podocytes. *Cell Physiol. Biochem.* **2014**, *34*, 891–902.
40. Kim, H.J.; Vaziri, N.D. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2010**, *298*, F662–F671.
41. Marzec, J.M.; Christie, J.D.; Reddy, S.P.; Jedlicka, A.E.; Vuong, H.; Lancken, P.N.; Aplenc, R.; Yamamoto, T.; Yamamoto, M.; Cho, H.Y.; *et al.* Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J.* **2007**, *21*, 2237–2246.
42. Marczak, E.D.; Marzec, J.; Zeldin, D.C.; Kleeberger, S.R.; Brown, N.J.; Pretorius, M.; Lee, C.R. Polymorphisms in the transcription factor NRF2 and forearm vasodilator responses in humans. *Pharmacogenet Genomics* **2012**, *22*, 620–628.
43. Chen, Y.; Wu, Y.; Wu, Y.; Lee-Chen, G.; Chen, C. Genetic analysis of *NFE2L2* promoter variation in Taiwanese Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2013**, *19*, 247–250.
44. Shimoyama, Y.; Mitsuda, Y.; Tsuruta, Y.; Hamajima, N.; Niwa, T. Polymorphism of *Nrf2*, an antioxidative gene, is associated with blood pressure and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Int. J. Med. Sci.* **2014**, *11*, 726–731.
45. Koren, E.; Kohen, R.; Ginsburg, I. Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Exp. Biol. Med.* **2010**, *235*, 689–699.

46. Chirino, Y.; Sanchez-González, J.; Martínez-Martínez, C.; Cruz, C.; Pedraza-Chaverri, J. Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology* **2008**, *245*, 18–23.
47. González-Reyes, S.; Guzmán-Beltrán, S.; Medina-Campos, O.; Pedraza-Chaverri J. Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/801418.
48. White, C.; Viernes, H.; Krejsa, C.; Botta, D.; Kavanagh, T. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* **2003**, *318*, 175–180.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).