



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**ACTIVIDAD DE LA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE ERITROCITOS HUMANOS Y  
SU ASOCIACIÓN CON EL TRATAMIENTO HIPOGLUCEMIANTE EN LA DIABETES  
MELLITUS TIPO 2.**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
M. en C. ALEJANDRA PICAZO SANSÓN**

**TUTOR PRINCIPAL  
DRA. DIANA BARRERA OVIEDO  
Facultad de Medicina**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. ADRIANA MONROY GUZMAN  
Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga  
DR. JORGE ESCOBEDO DE LA PEÑA  
Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Dr. Carlos Mac  
Gregor Sánchez Navarro**

**Ciudad Universitaria CDMX, mayo 2017.**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

- ✓ Al posgrado de Maestría y Doctorado de Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud (Investigación Clínica Experimental en Salud).
  
- ✓ Al “PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA” de la UNAM, por el financiamiento otorgado a la Dra. Diana Barrera Oviedo con el proyecto DGAPA-PAPIIT IN211713.
  
- ✓ AL PROGRAMA DE APOYOS DE PROYECTOS CONACYT-SALUD 2013-01 201519; quien dio un apoyo complementario otorgado al Dr. José Pedraza Chaverri.
  
- ✓ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por su apoyo otorgado para la realización de mi doctorado con número de becario 162708.

## DEDICATORIAS

- *A toda mi familia en especial a mi madre María Elena por su apoyo incondicional para lograr una meta más en mi vida. También, a mi padre Juan Alejandro y Andrés por enseñarme a tener confianza ante cualquier circunstancia.*
- *A la Dra. Diana Barrera Oviedo y a la Dra. Adriana Monroy Guzmán, por su asesoría en todos los aspectos del proyecto.*
- *A la Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano, a todas las clínicas y al personal involucrado en el reclutamiento de pacientes.*
- *A mis grandes amigos de la facultad en especial a la Dra. Angélica S. Jiménez Osorio por su apoyo y aclaración de dudas durante mi estancia en el doctorado.*
- *Y a la vida por los 2 hermosos hijos que me permitió conocer y compartir con Iván.*

	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	4
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	7
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS</b>	8
<b>ABREVIATURAS</b>	10
<b>RESUMEN</b>	13
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	15
<b>II. ANTECEDENTES</b>	16
2.1 Diabetes mellitus.	16
2.2 Epidemiología.	17
2.3 Tipos clínicos de diabetes mellitus.	18
2.4 Diagnóstico de la diabetes.	20
2.5 Prediabetes.	21
2.6 Fisiopatología de la diabetes.	23
2.7 Resistencia a la insulina.	31
2.8 Estrés oxidante en la diabetes.	34
2.9 Mecanismos generales en el desarrollo de la diabetes.	41
2.10 Estrés oxidante y el desarrollo de complicaciones en la diabetes.	45
2.11 Aldehído deshidrogenasa.	47
2.12 Aldehído deshidrogenasa y diabetes.	49
2.13 Tratamiento de la diabetes mellitus Tipo 2.	51

2.13.2 Características de los fármacos hipoglucemiantes.	53
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	55
<b>IV. OBJETIVOS</b>	56
4.1 Objetivo general.	56
4.2. Objetivos particulares.	56
<b>V. HIPÓTESIS</b>	57
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	57
6.1 Diseño y población del estudio.	57
6.2 Tamaño de la muestra.	59
6.3 Obtención de las muestras y perfil bioquímico clínico.	62
6.4 Actividad de las enzimas antioxidantes.	62
6.5 Concentraciones de marcadores de estrés oxidante.	65
6.6 Análisis estadístico.	66
<b>VII. RESULTADOS</b>	67
7.1. Características de la población de estudio.	67
7.1.1 Características clínicas y antropométricas.	67
7.1.2 Características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM2.	69
7.2 Actividad de la ALDH y de las enzimas antioxidantes.	74
7.3 Marcadores de estrés oxidante.	80
7.5 Asociación de las actividades enzimáticas y concentraciones de marcadores en la DM2.	84

<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	87
<b>IX. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS</b>	94
<b>X. CONCLUSIÓN</b>	95
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	96
<b>XII. ANEXOS</b>	114

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Criterios de diagnóstico de diabetes establecidos por la OMS y la ADA.	20
<b>Tabla 2.</b> Criterios para diagnóstico de prediabetes (categoría de riesgo aumentado de diabetes).	22
<b>Tabla 3.</b> Criterios de diagnóstico para la prediabetes.	22
<b>Tabla 4.</b> Criterios de cálculo del HOMA-IR y HOMA- $\beta$ .	33
<b>Tabla 5.</b> Objetivos de control glucémico.	51
<b>Tabla 6.</b> Características clínicas y antropométricas de los grupos de estudio.	68
<b>Tabla 7.</b> Características clínicas y antropométricas de los pacientes diabéticos con (DM2 T) y sin (DM2 NT) tratamiento farmacológico hipoglucemiante.	70
<b>Tabla 8.</b> Características clínicas y antropométricas de los pacientes diabéticos con tratamiento farmacológico hipoglucemiante con (DM2 T CT) y sin (DM2 T NCT) control glucémico.	72
<b>Tabla 9.</b> Características clínicas y antropométricas de los pacientes diabéticos sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante con (DM2 NT CT) y sin (DM2 NT NCT) control glucémico.	73
<b>Tabla 11.</b> % Asociaciones significativas de actividades antioxidantes y marcadores de estrés oxidante en RI, GAA y DM2.	85



<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Funciones metabólicas de la insulina	24
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de liberación de insulina dependiente de glucosa en las células $\beta$ del páncreas.	25
<b>Figura 3.</b> Vía de señalización de la insulina en una célula del músculo esquelético.	27
<b>Figura 4.</b> Mecanismos implicados en la fisiopatología de la DM2 .	29
<b>Figura 5.</b> Fuentes de estrés oxidante. Principales especies reactivas de oxígeno ( $O_2^{\bullet-}$ , $H_2O_2$ , $OH^{\bullet}$ ) y enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), y catalasa (CAT) [60].	36
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de inicio de LPO.	37
<b>Figura 7.</b> Modificación oxidante de lípidos .	38
<b>Figura 8.</b> Participación de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) en estados de hiperglucemia.	40
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de defensa antioxidante SOD, GPx, CAT.	43
<b>Figura 10.</b> Acción de la enzima glutatión peroxidasa.	44
<b>Figura 11.</b> Participación de ALDH en diabetes.	50

<b>Figura 12.</b> Actividad de enzimas antioxidantes (ALDH, SOD, CAT, GPx) en los diferentes grupos de estudio.	75
<b>Figura 13.</b> Actividad de enzimas antioxidantes (ALDH, SOD, CAT, GPx) en DM2 clasificados por tratamiento farmacológico hipoglucemiante.	76
<b>Figura 14.</b> Actividad de enzimas antioxidantes (ALDH, SOD, CAT, GPx) en DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante clasificadas por control glucémico.	78
<b>Figura 15.</b> Actividad de enzimas antioxidantes (ALDH, SOD, CAT, GPx) en DM2 sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante clasificadas por control glucémico.	79
<b>Figura 16.</b> Concentraciones de marcadores de EO (ERO, TBARS) en los diferentes grupos de estudio.	80
<b>Figura 17.</b> Concentraciones de marcadores de EO (ERO, TBARS) en DM2 clasificados con tratamiento farmacológico hipoglucemiante.	81
<b>Figura 18.</b> Concentraciones de marcadores de EO (ERO, TBARS) en DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante y clasificadas por control glucémico.	82
<b>Figura 19.</b> Concentraciones de marcadores de EO (ERO, TBARS) en DM2 sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante clasificados por control glucémico.	83
<b>Figura 20.</b> Integración de los resultados en los pacientes con DM2.	94
<b>Diagrama 1.</b> Tamaño de la muestra en cada etapa del estudio.	61

## ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ALDH	Aldehído deshidrogenasa.
ADP	Adenosín difosfato.
ATP	Adenosina trifosfato.
CAT	Catalasa.
Ca <sup>+2</sup>	Iones calcio.
CT	Colesterol total.
DG	Diabetes gestacional
DM	Diabetes mellitus.
DM1	Diabetes mellitus tipo 1.
DM2	Diabetes mellitus tipo 2.
DM2 T	Pacientes con DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante.
DM2 NT	Pacientes con DM2 sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante
DM2 TCT	Pacientes con DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante y control glucémico (HbA1c < 7%).
DM2 T NCT	Pacientes con DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante sin control glucémico (HbA1c ≥ 7%).
DM2 NT CT	Pacientes con DM2 sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante y control glucémico (HbA1c < 7%).
DM2 NT NCT	Pacientes con DM2 sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante sin control glucémico (HbA1c ≥ 7%).
DMNID	Diabetes mellitus no insulino dependiente.
DCFH-DA	Dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato.
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

EDTA	Ácido etildiaminotetraacético.
EO	Estrés oxidante.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FID	Federación Internacional de Diabetes.
GAA	Glucemia alterada en ayuno.
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa.
GLP-1	Péptido similar al glucagón.
GLUT	Transportador de glucosa.
GPx	Glutación peroxidasa.
HbA1c	Hemoglobina glucosilada.
C-HDL	Colesterol de alta densidad
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal.
HOMA-IR	Modelo homeostático de evaluación de resistencia a la insulina.
HOMA-β	Modelo de funcionalidad de célula β.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
HO	Hemo oxigenasa.
INS	Instituto de Salud Pública.
IGT	Intolerancia a la glucosa en ayunas.
IR	Receptor de insulina.
IP3	Inositol 1,4, 5-trifosfato.
IV	Intravenoso.
K <sup>+</sup>	Iones potasio.
C-LDL	Colesterol ligado a lipoproteína de baja densidad
LPO	Lipoperoxidación.
MDA	Malondialdehído.
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidrógeno.
NBT	Nitroazul de tetrazolio.
NFκB	Factor nuclear kappa B.
NG	Normoglucémicos.
NG RI	Normoglucémicos con resistencia a la insulina.
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
$O_2^{\bullet-}$	Anión superóxido.
OH•	Radical hidroxilo.
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito.
$^1O_2$	Singulete de oxígeno.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PKC	Proteína cinasa C.
PRE	Grupo prediabéticos.
RE	Retículo endoplásmico.
RI	Resistencia a la insulina.
RL	Radicales libres.
SNC	Sistema nervioso central.
SOD	Superóxido dismutasa.
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.
TGA	Tolerancia a la glucosa alterada.
TAG	Triacilgliceroles.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa.
Trx-R	Tiorredoxina reductasa.
Trx-P	Tiorredoxina peroxidasa.
UF	Unidades de fluorescencia.

## RESUMEN

**Antecedentes:** La diabetes mellitus es una de las primeras causas de muerte en México. El estrés oxidante juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina y de la diabetes. Como una de las derivaciones del estrés oxidante, se encuentra aumentada la lipoperoxidación asociada con la diabetes mellitus tipo 2, por lo que el sistema antioxidante resulta esencial. La enzima aldehído deshidrogenasa, participa en la detoxificación de los aldehídos formados durante esta lipoperoxidación.

Sin embargo, la información de la actividad del aldehído deshidrogenasa y otras variables de estrés oxidante durante la prediabetes y la diabetes con tratamiento hipoglucemiante es escasa. Estudios clínicos con respecto al aldehído deshidrogenasa se han enfocado en el estudio de la asociación de los polimorfismos en la diabetes y el metabolismo del alcohol, que sugieren la asociación del aldehído deshidrogenasa con la diabetes. Por lo que sería útil conocer la asociación de la actividad antioxidante además de otras variables de estrés oxidante en la diabetes mellitus tipo 2 con el tratamiento hipoglucemiante y con el control glucémico para determinar su utilidad como pronóstico en el desarrollo y establecimiento de la enfermedad.

**Hipótesis:** La actividad de la enzima ALDH presente en eritrocitos humanos será mayor y presentará una asociación en pacientes con DM2 y tratamiento farmacológico hipoglucemiante.

**Objetivo:** Evaluación de la actividad de la ALDH y el estatus de estrés oxidante (marcadores de EO y actividades de enzimas antioxidantes) en pacientes con resistencia a la insulina y pacientes con DM2 y tratamiento hipoglucemiante.

**Metodología:** Este fue un estudio transversal. La población consistió en 507 sujetos mexicanos, 177 sujetos normo glucémicos, 60 sujetos normo glucémicos con resistencia a la insulina, 104 pacientes con glucosa alterada en ayunas y 166 pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2.

El grupo de diabetes mellitus tipo 2 se re-clasificó con base al tratamiento hipoglucemiante. Finalmente tanto los grupos de diabéticos con y sin tratamiento se clasificaron en controlados y no controlados de acuerdo a la hemoglobina glucosilada.

Se evaluaron los parámetros clínicos, actividades enzimáticas antioxidantes de la aldehído deshidrogenasa, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y se determinaron especies reactivas de oxígeno y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico).

**Resultados:** Las actividades de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidante fueron mayores en pacientes con diabetes tipo 2 con tratamiento hipoglucémico. Asimismo, desde la presencia de resistencia a la insulina se encontró un desbalance presentando tanto mayor actividad de glutatión peroxidasa y de concentraciones de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. El aumento de las actividades de las enzimas aldehído deshidrogenasa y superóxido dismutasa se asociaron a la diabetes mellitus tipo 2 con tratamiento siendo un efecto compensatorio contra los productos de lipoperoxidación y las especies reactivas de oxígeno.

Se sugiere que este nuevo estado antioxidante permita a los pacientes disminuir la predisposición de la enfermedad y no desarrollar las complicaciones clásicas de la diabetes mellitus tipo 2.

**Conclusión:** En este estudio se determinaron mayores actividades de ALDH y SOD asociadas al tratamiento farmacológico hipoglucemiante. La DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante y control glucémico presentó un mayor actividad antioxidantes (ALDH, SOD, GPx y CAT) lo cual puede ayudar a prevenir el desarrollo de complicaciones.

## I. INTRODUCCIÓN

La Federación Internacional de la Diabetes (FID) estimó en el 2015 que aproximadamente 451 millones de personas en el mundo padecen diabetes [1]. Cerca del 80% vive en países de ingresos medios y bajos. Si siguen estas tendencias, para el año 2035 habrá unos 592 millones de personas, o un adulto de cada 10, tendrá diabetes. Esto equivale a aproximadamente tres casos nuevos cada 10 segundos, es decir, casi 10 millones por año [2]. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT), identificó que alrededor del 9.2% de la población mexicana sufre de diabetes [3].

Durante el EO presente desde la RI existe un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) involucrados en la RI [6, 7,8] y que en algunos estudios se ha demostrado que el EO se asocia con disfunción de las células beta ( $\beta$ ) y posterior desarrollo de resistencia a la insulina (RI) [4, 5, 6].

Asimismo, durante la hiperglucemia y la diabetes en conjunto con un aumento de EO también existe mayor lipoperoxidación (LPO) [8, 9]. Durante la LPO existen productos finales oxidados como el MDA los cuales son tóxicos sin embargo, la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) puede metabolizarlos. La ALDH es una de las principales enzimas responsables del metabolismo o la desintoxicación de acetaldehído y otros aldehídos tóxicos [9-12]. Sin embargo, poco se sabe de su papel en humanos en etapas previas a la diabetes, como es en la glucosa alterada en ayunas (GAA) y en el desarrollo de la enfermedad.

Durante la RI y la DM2 se han estudiado variables involucradas en los estados de EO que sirvan como predictores y/o marcadores circulantes de EO y LPO permitiendo la apertura de una nueva vía de estudio e intervención de la enfermedad en población mexicana.



## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Diabetes mellitus**

El término diabetes mellitus (DM) define alteraciones metabólicas de múltiples etiologías caracterizadas por trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono que provocan hiperglucemia crónica y de los lípidos como resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma o en ambas [13].

En la DM pueden presentarse síntomas característicos, como poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. Frecuentemente, los síntomas no son graves o no se aprecian por lo cual, la hiperglucemia puede provocar cambios funcionales y patológicos previos a la aparición de alguna manifestación clínica. Las complicaciones crónicas de la DM incluyen el progresivo desarrollo de micro y macroangiopatías, como la retinopatía, con potencial ceguera, la nefropatía, que puede llevar a falla renal, neuropatía periférica con riesgo de úlceras plantares, pie de Charcot con necrosis distal que puede llevar a la amputación, infecciones crónicas, alteraciones odontológicas, neuropatía autonómica, enfermedades cardiovasculares, como cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares o arteriopatía periférica [13, 14].

## 2.2 Epidemiología

En el 2015, la FID estimó que había 415 millones de personas diagnosticadas con diabetes en el mundo y que para el año 2035, el número de personas diabéticas se incrementará a 592 millones [1]

Según la ENSANUT 2012 [2], emitida por el Instituto Nacional de Salud Pública (INS), México se encuentra entre los primeros 10 países con mayor número de diabéticos. La prevalencia nacional de diabetes 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 que va de 10.2 a 12.3 % [3].

En México, la DM representa un problema de salud pública considerando costos elevados para el sector salud [15]. Las personas que padecen esta enfermedad acuden con mayor frecuencia a las unidades de atención médica y tienen una mayor probabilidad de ingresar a los servicios de urgencias y, debido a las múltiples complicaciones, requieren hospitalizaciones más prolongadas en comparación con los individuos no diabéticos [15]. Los costos directos e indirectos de la diabetes en el Sistema Nacional de Salud Mexicano anualmente alcanzan hasta los 7 mil 784 millones de dólares, de los cuales 3 mil 422 mil millones corresponden a costos directos del sistema de salud y 4 mil 352 millones a gastos indirectos atribuibles a discapacidad permanente, temporal y a mortalidad prematura [15].

## **2.3 Tipos clínicos de diabetes mellitus**

### **1) Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) :**

Conocida como diabetes mellitus (DM) dependiente de insulina, de inicio en la juventud, con tendencia a la cetosis o inestable, es la forma más grave de la diabetes mellitus primaria y la menos frecuente (1 a 2 % del total en México). Suele afectar a individuos jóvenes, aunque puede iniciarse a cualquier edad. Se caracteriza por la falta de insulina endógena y por una notable tendencia a la cetosis cuando la administración exógena de insulina falta. En su forma característica tiene inicio súbito y a menudo su primera manifestación es la cetoacidosis. Por lo general afecta a individuos que están en su peso ideal [16].

La DM1, afecta más a niños y adolescentes, se acompaña de marcadores serológicos de autoinmunidad y avanza con rapidez hacia la cetosis por la falta absoluta de insulina [16].

### **2) Diabetes mellitus tipo 2 (DM2):**

Conocida anteriormente diabetes mellitus no dependiente de insulina, diabetes de adulto, de inicio en la madurez, resistente a la cetoacidosis o estable, es la forma más frecuente de diabetes mellitus primaria (98 a 99% del total en México). Suele iniciarse a partir del cuarto decenio de la vida y su prevalencia aumenta con la edad. Sus síntomas aparecen de manera gradual a diferencia de la DM1, y con frecuencia tiene un curso asintomático, en cuyo caso se descubre en forma incidental por un examen de laboratorio de rutina. 80 a 85% de los pacientes con DM2 es obesa en el momento del diagnóstico (algunos pierden peso después) y una minoría está en su peso ideal [16].

Aunque la concentración plasmática de insulina puede parecer normal o aun elevada en cifras absolutas (en comparación con la de individuos no obesos con tolerancia normal a la glucosa), en realidad es anormalmente baja para la concentración prevalente de glucosa o cuando se comparan sujetos diabéticos y no diabéticos con el mismo grado de obesidad [17].

### **3) Diabetes gestacional (DG):**

Se refiere a cualquier grado de hiperglucemia con el inicio en el embarazo. Se caracterizan por valores que, pese a ser superiores a los normales, son inferiores a los establecidos para diagnosticar una diabetes. Durante el embarazo se producen más hormonas placentarias que no permiten que el cuerpo use insulina de forma adecuada además, de tener un aumento de peso y de un aumento de producción de péptidos por tejido adiposo que desencadenan en RI [16, 18].

Es importante identificar a los pacientes con este diagnóstico, porque el tratamiento oportuno, reduce la mortalidad tanto materna como fetal y las mujeres afectadas tienen un elevado riesgo de presentar diabetes mellitus en los años que siguen al parto. Aunque se estima que la DG ocurre en alrededor de 2% de todos los embarazos en países industrializados, en México la situación es diferente y la mayor parte de los estudios de prevalencia de DG señala una frecuencia de 6 a 11% de todos los embarazos [18].

### **4) Otros tipos específicos de diabetes son provocados por diversas causas como defectos genéticos y del páncreas exócrino:** debido a otras causas como:

- Entre los defectos genéticos de la función de las células beta pancreáticas (MODY, por sus siglas en inglés). Incluyen los defectos monocitogenéticos que afecta la capacidad funcional de la célula beta. Se caracterizan por tener un patrón hereditario autosómico dominante, por que la hiperglucemia por lo general se inicia antes de los 25 años de edad y c) por que el defecto radica en la secreción de la insulina y no en su acción [16, 18]
- Entre las enfermedades del páncreas exocrino cualquier proceso patológico que afecte el páncreas en forma difusa puede causar diabetes, incluye enfermedades como pancreatitis, traumatismo, infección, pancreatectomía, hemocromatosis, fibrosis quística y carcinoma pancreático.

## 2.4 Diagnóstico de la diabetes

Los criterios de diagnóstico de la diabetes, establecidos por OMS [13] y la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) [18] son los más utilizados (Tabla 1). Ambas organizaciones incluyen como criterios de diagnóstico los niveles de glucosa plasmática, ya sea en ayunas (de 8 a 12 horas de ayuno) o posterior a 2 horas tras una carga oral de 75 g de glucosa. Sin embargo, la ADA propuso la inclusión de la HbA1c como un tercer criterio de diagnóstico [18, 20] y recomienda la medición de la glucosa al azar cuando los individuos presentan síntomas propios de la hiperglucemia como mareos frecuentes, polidipsia, poliuria y polifagia [18].

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

<b>Criterio</b>	<b>OMS 2006</b>	<b>ADA 2010</b>
<i>Glucosa sérica en ayunas</i> (Ayuno de 8 a 12 horas)	> 125 mg /dL ó 7 mmol/L	≥ 126 mg/dL ó 7 mmol/L
<i>Glucosa sérica de 2 h</i> Tras carga oral de 75 g de glucosa	> 199 mg/dL ó 11.0 mmol/L	≥ 200 mg/dL ó 11.1 mmol/L
<i>HbA1c 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 ó 11.1 mmol/L

Abreviaturas: OMS: Organización mundial de la Salud, ADA: Asociación Americana de Diabetes. Datos adaptados de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) [13, 18, 19].

La encuesta de Salud Nacional y Examen de Nutrición (ESNEN) [21], indica que un punto de corte de HbA1c ≥ 6.5% detecta un tercio más de pacientes con diabetes sin diagnosticar que una prueba de glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dl.

Es importante tener en cuenta algunas variables como la edad, raza/etnia y la presencia de anemia o de alguna hemoglobinopatía cuando se usa la HbA1c para diagnosticar diabetes debido a que se ha encontrado que estos valores se ven modificados. Los estudios epidemiológicos muestran, hasta el momento, que la HbA1C es solo útil para adultos, sin embargo, sigue en discusión si debe seguir siendo el mismo punto de corte tanto para adultos como adolescentes y niños [18].

## **2.5 Prediabetes.**

En 1979, el Grupo Nacional de Datos propuso el término tolerancia a la glucosa alterada (TGA) para reemplazar a la denominación más antigua de diabetes química, asintomática o limítrofe acuñada en 1965. En este concepto anterior se incluía a individuos con carga genética de DM aun sin alteraciones bioquímicas demostrables del metabolismo de los carbohidratos [21].

En 1997, la ADA recomendó utilizar el término prediabetes cuando el valor de la glucemia en ayuno oscilara entre 110 y 125 mg/dL (glucosa alterada en ayunas) o entre 140 y 199 mg/dL (intolerancia a la glucosa (ITG) dos horas después después de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra. En el año 2004, la ADA precisa el punto de corte de la glucemia normal por debajo de 100 mg/dL y amplía los límites para el diagnóstico de GAA [18, 22].

Es posible definir la prediabetes o estado prediabético como una anomalía en la cual las concentraciones de glucemia son más elevadas que las referencias consideradas normales hoy en día, pero por debajo del punto de corte asignado para la DM. Este trastorno incluye los términos de GAA, IGT o ambos (Tabla 2) [23].

**Tabla 2.** Criterios para diagnóstico de prediabetes (categoría de riesgo aumentado de diabetes).

<b>Criterio</b>	<b>Categoría</b>
Hiperglucemia en ayuno	100 a 125 mg/dL ó 5.6 a 6.9 mmol/L
Intolerancia a la glucosa	140 a 199 mg/dL ó 7.8 a 11 mmol/L

[21, 22]

En el año 2003, la ADA 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 3) sin embargo, se encuentran en rangos más elevados como para ser considerados normales [18, 19].

**Tabla 3.** Criterios de diagnóstico para la prediabetes.

<b>Criterio</b>	<b>Normal</b>	<b>Prediabetes</b>
<i>Glucosa sérica en ayunas (Ayuno de 8 a 12 horas)</i>	≤ 99 mg /dL ó 5.5 mmol/L	100 a 125 mg/dL ó 5.6 a 6.9 mmol/L
<i>Hemoglobina glucosilada en ayunas (Ayuno de 8 a 12 horas)</i>	≤ 5.6 %	5.6 a 6.4%
<i>Glucosa sérica de 2 h tras carga oral de 75 g de glucosa</i>	≤139 mg/dL ó 7.7 mmol/L	140 a 199 mg/dL ó 7.8 a 11 mmol/L

Datos adaptados de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) [18, 19]

Es importante identificar la prediabetes como entidad. Múltiples estudios demuestran que al identificar y modificar el estilo de vida, regular los factores de riesgo que integran el síndrome metabólico y controlar de mejor forma la intolerancia a los carbohidratos es posible retrasar y evitar la progresión hacia la diabetes hasta en un 58% de los casos [23].

## **2.6 Fisiopatología de la diabetes**

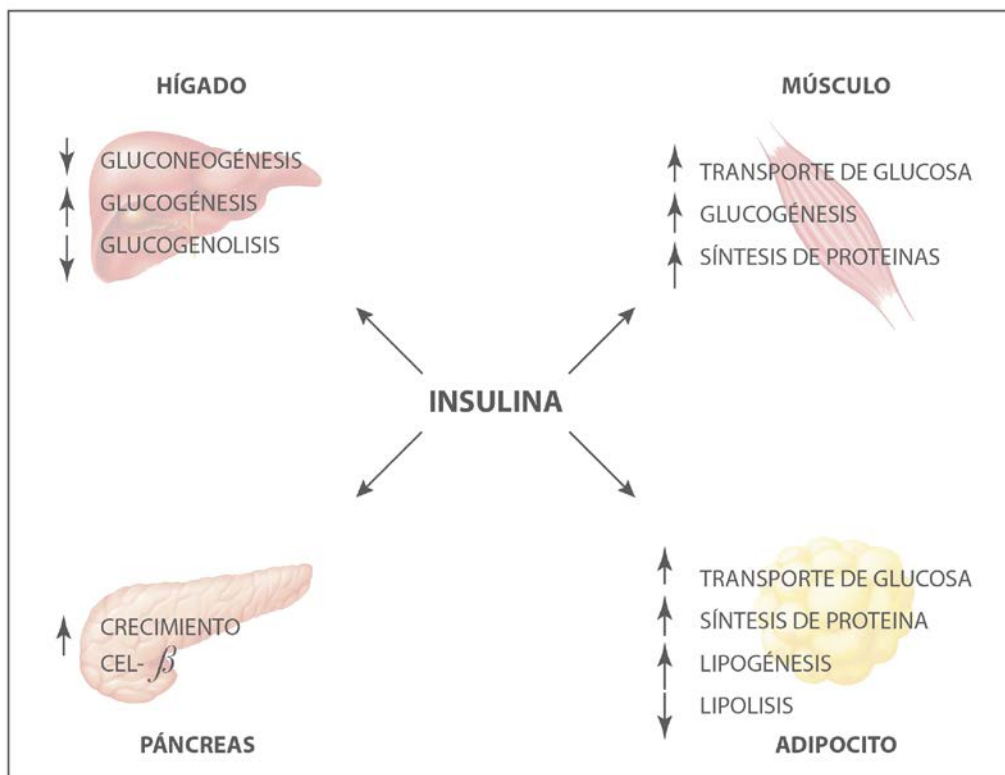
En la DM2, el páncreas es incapaz de mantener la producción adecuada de insulina ante una demanda que se incrementa por la disminución de la actividad biológica de la hormona, esta disminución en la sensibilidad de los tejidos, también llamada resistencia, afecta en diferentes grados el metabolismo de la glucosa y los lípidos, sobre todo en los tejidos muscular, hepático y adiposo. Aunque la disminución en la captación y uso de la glucosa mediada por insulina en el músculo representa sólo un aspecto de este fenómeno, a menudo se utiliza como indicador de la resistencia a la insulina [24].

La insulina es un péptido de 51 residuos de aminoácidos secretado por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas, ejerce acciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, electrolitos además de promover la división celular y el crecimiento [25]. Es una hormona anabólica por excelencia; permite disponer a las células del aporte necesario de glucosa para los procesos de síntesis con gasto de energía.

Sin embargo, la retroalimentación fisiológica dominante se da en la glucosa, por lo que la secreción de insulina está acoplada a los niveles de glucosa por medio de una relación dosis respuesta que es necesaria para mantener la concentración de glucosa plasmática dentro de un rango ( $\sim 4.5$  mmol/L) [26].



La insulina ejerce acciones metabólicas a través de sus órganos blancos impidiendo la liberación de glucosa por el hígado y promoviendo la captura de glucosa por el músculo y tejido adiposo (Figura 1). Así como también, la insulina favorece el metabolismo de glucosa, regula el transporte de iones y aminoácidos, regula el metabolismo de lípidos, síntesis de glucógeno, transcripción genética, síntesis y degradación de proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN) [25].

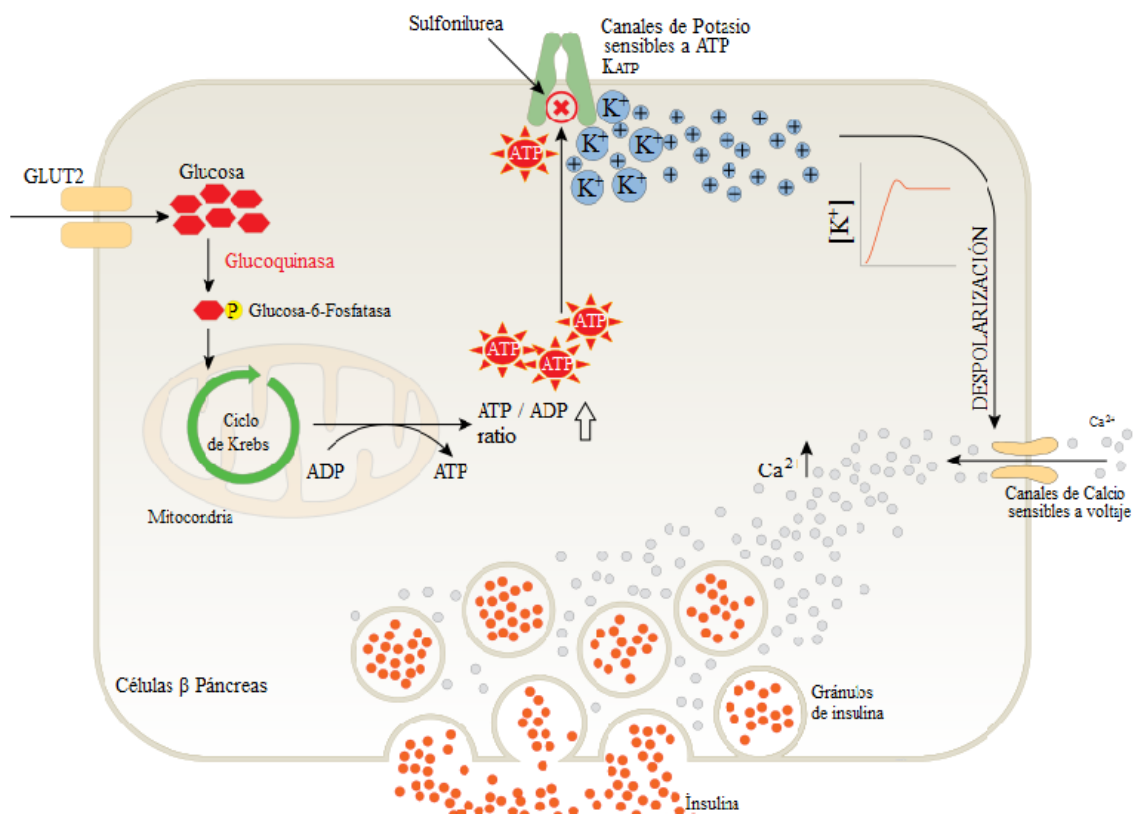


**Figura 1.** Funciones metabólicas de la insulina.

La liberación de insulina se desencadena por el páncreas en respuesta a un aumento en el nivel de glucosa en sangre, por ejemplo después de una comida rica en energía. Posterior a su liberación la insulina actúa incrementando el número de transportadores (GLUT) en el cuerpo permitiendo que la glucosa entre a las células y se utilice como fuente de energía [27].

Entre otras sustancias que pueden estimular la liberación de insulina tenemos a los aminoácidos de las proteínas ingeridas, la acetilcolina liberada de las terminaciones del nervio vago (sistema nervioso parasimpático), la colestocinina (secretada por células enteroendocrinas de la mucosa intestinal) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) [27].

El mecanismo de liberación de insulina dependiente de glucosa en las células  $\beta$  del páncreas se muestra en la Figura 2 [27,28].



**Figura 2.** Mecanismo de liberación de insulina dependiente de glucosa en las células  $\beta$  del páncreas (adaptado de Vinay y col, 2005 [29]).

Donde:

1. La glucosa entra en las células  $\beta$  a través del transportador de glucosa GLUT2.

2. La glucosa es metabolizada mediante la glucólisis, el ciclo de ácidos tricarboxílicos donde se producen, por oxidación, varias moléculas de ATP (adenosina trifosfato).

3. Los canales de potasio ( $K^+$ ) dependientes de ATP y, por tanto, de los niveles de glucosa en sangre, se cierran despolarizando la membrana.

4. Con la despolarización de la membrana, los canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ) dependientes de voltaje se abren y el calcio entra la célula.

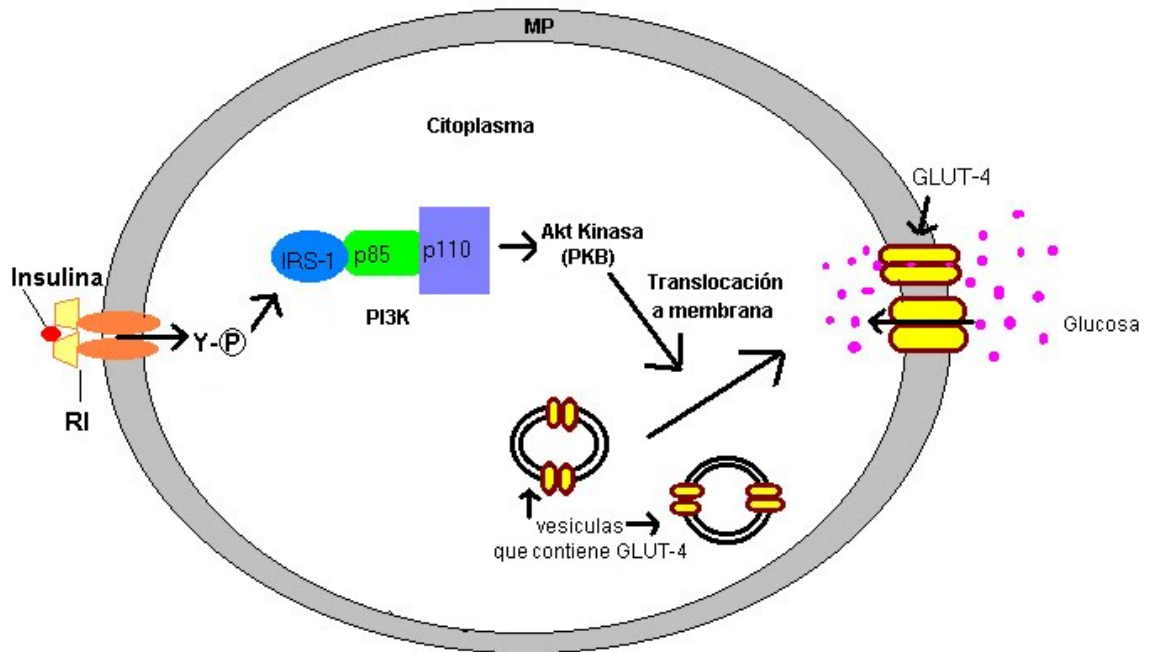
5. Un aumento en el nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular produce la activación de fosfolipasa C, que desdobla los fosfolípidos de membrana fosfatidil inositol 4,5-bifosfato en inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol.

6. El inositol 1, 4,5-trifosfato (IP3) se une a los receptores proteicos sobre la membrana del retículo endoplásmico (RE). Esto permite la liberación de  $Ca^{2+}$  del RE a través de los canales IP3 aumentando más aún la concentración intracelular de calcio.

7. Estas cantidades significativamente mayores de  $Ca^{2+}$  dentro de la célula funcionan como mensajeros para la liberación de la insulina previamente sintetizada y almacenada en las vesículas secretoras.

Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular (Figura 3), en las cuales la fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina (Tyr) lleva una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr).

Estas cinasas son las responsables de transmitir la señal de la insulina para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula. La activación de estas cinasas, estimulan que el transportador de glucosa (GLUT) se transloque a la membrana [28].



**Figura 3.** Vía de señalización de la insulina en una célula del músculo esquelético. IRS-1: Receptor de insulina, PI3 Kinasa (fosfoinositol 3-quinasa o PI3K), GLUT-4: Transportador de glucosa.

Diferentes acontecimientos están involucrados en la culminación de la DM2, entre ellos tenemos a la RI la cual precede por años a la intolerancia a la glucosa y al inicio de la diabetes, como. También la sensibilidad a la insulina. En ambos casos la resistencia es independiente del grado de obesidad. Estos argumentos llevaron a proponer que el fenómeno primario en la presentación de la DM2 es la RI y que el defecto pancreático no es sino la consecuencia del agotamiento de las células beta. Sin embargo, también se demostraron defectos muy tempranos en la secreción de insulina tanto en etapas preclínicas de la diabetes como en familiares de primer grado de pacientes con DM2.

Además, muchos individuos con RI igual o mayor que la que se observa en la diabetes son capaces de mantener una secreción elevada de insulina durante periodos prolongados y conservar normal la tolerancia a la glucosa, por lo que el grado y la duración de la resistencia a la insulina que se requieren para la presentación de diabetes quizá dependan de la capacidad innata de las células beta de adaptarse a la situación.

La respuesta secretoria disminuye en términos absolutos y la glucemia en ayunas se eleva una vez que se pierde 75% de la capacidad funcional de las células beta del páncreas [24].

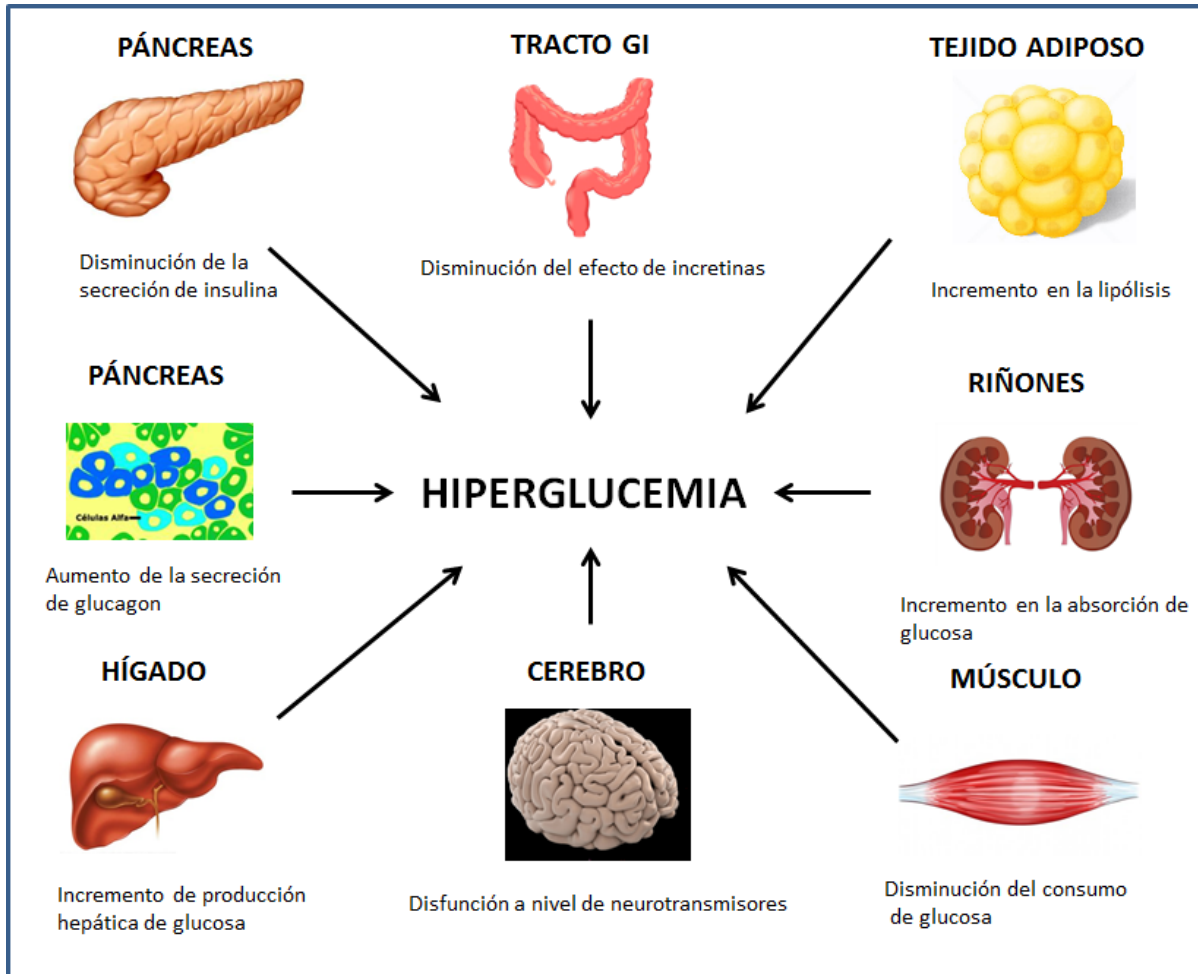
En cualquier caso es claro que ambos defectos, tanto de secreción como la acción de insulina, son necesarios para el desarrollo de la DM2 [30].

La susceptibilidad de padecer DM2 tiene un claro componente hereditario siendo de una enfermedad multifactorial y poligénica. La enfermedad ocurre con mayor frecuencia en los familiares de un individuo afectado que en la población en general [24- 31].

Los principales factores adquiridos que contribuyen a la presentación de DM2 son aquellos que se relacionan con aumento de la RI, los identificados son obesidad, inactividad física, embarazo y edad. La inmensa mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes es obesa en los años que anteceden al inicio de la enfermedad y aún quienes se encuentran dentro de su peso ideal con frecuencia tienen exceso de tejido adiposo en la región abdominal [32].

La RI es una alteración genética o adquirida de la respuesta tisular a la acción de la insulina teniendo que las alteraciones más importantes son: a) disminución de la acción antilipolítica, b) reducción en la capacidad de suprimir la gluconeogénesis y la producción hepática de glucosa y c) descenso en la captación y utilización de glucosa por el tejido muscular [32].

De Fronzo [33], menciona hasta ocho mecanismos implicados en la fisiopatología de la DM2, por la participación no solo 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. Estos mecanismos juegan un papel importante en el desarrollo de la intolerancia a la glucosa en individuos con DM2 (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismos implicados en la fisiopatología de la DM2 (adaptado de DeFronzo, 2009) [33].

Se ha determinado que durante la DM2 existe un incremento en la producción de glucagon, no era de esperarse que se reconociera a las células  $\alpha$  del páncreas en la patogenia de la enfermedad [34]. 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 disminuir o alterar a largo plazo la secreción a insulina [35].

Por otro lado, las incretinas juegan un papel importante en la secreción de insulina y por tanto, en la disminución de la producción de glucagon. Dos de las incretinas secretadas en el intestino durante periodos de alimentación son el péptido 1 similar al glucagon (GLP-1) y el péptido inhibidor gástrico (GIP). En la DM2 se ha visto una producción deficiente de GLP-1 y un aumento de la estimulación de insulina por el GIP [36].

Se ha observado una respuesta adaptativa del riñón de conservar la glucosa necesaria al fin de satisfacer las demandas del cuerpo, por lo que esta se reabsorbe. Además, el cerebro y otros tejidos neuronales, principalmente, demandan más del 50% de glucosa [37, 38]. 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 [36].

Asimismo, también influyen tanto factores genéticos como ambientales en el desarrollo de la enfermedad. Se ha visto que la asociación genética es mayor en la DM2 que en la DM1 [39]. La DM2 afecta tanto a población caucásica [40], pero es mucho más alta en algunos grupos étnicos como los indios Pima [41], árabes e hidús [42]. El efecto del medio ambiente puede ser una posible razón de la mayor tasa de concordancia para la DM2 que para la DM1 [39]. Sin embargo, no todos estos factores se manifiestan en todos los pacientes por ello es importante la evaluación de diferentes marcadores involucrados que evidencien su presencia en el individuo, para la implementación de un mejor tratamiento.

## 2.7 Resistencia a la Insulina

La resistencia a la insulina (RI), es un estado patológico en el que las células del cuerpo tienen sensibilidad anormalmente baja a la insulina. Los individuos con RI están predispuestos al desarrollo de DM2, además de asociárseles frecuentemente un número importante de desórdenes de salud entre los que se encuentran la obesidad, la hipertensión, infección crónica y enfermedades de tipo cardiovascular [28].

De manera general, la RI se caracteriza por una disminución en la captación de glucosa en adipocitos y musculo esquelético además, de un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejidos adiposo y hepático. A nivel molecular, los mecanismos por los cuales se genera RI pueden ser múltiples y variar de un individuo a otro. Por lo tanto la RI, es la consecuencia de una deficiente señalización de insulina causada por mutaciones o modificaciones postraduccionales del receptor de insulina (IR) o de moléculas efectoras del mismo [43]. La RI puede deberse a un defecto en la unión de la insulina a su receptor (IR), pero frecuentemente se atribuye a las alteraciones posteriores a la unión de la insulina durante la transducción de señales, alterando la funcionalidad de su receptor hasta la actividad de proteínas localizadas [46-47].

Entre las alteraciones más comunes se encuentran la disminución del número de receptores y de su actividad cinasa; un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de proteínas clave como el receptor y su sustrato; la disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y defectos en la expresión y función del transportador GLUT- 4 [44]. De estas alteraciones el aumento en la fosforilación y la disminución de la N-acetilglucosaminilación de los residuos de Ser/Thr a nivel del IR, ha sido considerado como uno de los mecanismos clave en el desarrollo de la RI [45-47].

Un aumento en el estado de fosforilación de ambas proteínas puede alterar su asociación a otras proteínas, bloquear sitios de fosforilación Tyr, disminuir su activación e inducir su degradación [45-47].



Varios agentes y condiciones metabólicas han sido implicados como inductores de la RI. Los más comunes son los ácidos grasos libres; el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y otras citocinas. De esta forma, parece que la RI es consecuencia de la acción de una multitud de diferentes inductores. Por ejemplo, el incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres se encuentra asociado con muchos estados de resistencia a la insulina incluyendo obesidad y DM2. En humanos el contenido y composición de triglicéridos y fosfolípidos en el músculo correlaciona directamente con la presencia de RI [43, 48].

La RI es el defecto metabólico más común de las alteraciones que se agrupan en el síndrome metabólico, como la obesidad, la intolerancia a la glucosa, la hipertensión arterial, la dislipidemia y DM2 [43], es de gran importancia contar con herramientas para cuantificar la sensibilidad a la insulina en humanos que puedan ser usadas para investigar apropiadamente la epidemiología, los mecanismos fisiopatológicos, el beneficio de las intervenciones terapéuticas y el curso clínico de pacientes con RI.

El método ideal para medir sensibilidad a la insulina debería ser fisiológico, seguro, sencillo, reproducible, no invasivo, barato, cuantitativo, identificando pequeñas diferencias y distinguiendo entre sensibilidad hepática y periférica. Desafortunadamente los métodos existentes no reúnen todos estos criterios, por lo que la elección del procedimiento para determinar sensibilidad a la insulina dependerá de las características de la población y de la información requerida [26].

El Modelo homeostático (HOMA) se describió por primera vez en por Matthews et al; 1985 [49] y ha sido ampliamente usado desde su descripción siendo un método sencillo, no invasivo y barato para determinar la sensibilidad a la insulina. Es usado exclusivamente en estudios poblacionales y ensayos clínicos, donde la determinación de la sensibilidad a la insulina es de interés secundario o la factibilidad impide la realización de mediciones directas. El uso de HOMA para hacer comparaciones entre grupos étnicos es válida.

La relación entre la glucosa y la insulina en el estado basal refleja el equilibrio entre la producción de la glucosa hepática y la secreción de insulina, que se mantiene mediante una retroalimentación entre el hígado y las células beta [50-52].

El HOMA-IR es un modelo matemático que utiliza concentraciones de glucosa e insulina plasmática en ayuno para estimar la sensibilidad a la insulina y el HOMA-β significa el % de función de la célula B [45, 49]. En la Tabla 4 se muestran las formulas de evaluación.

**Tabla 4.** Criterios de cálculo del HOMA-IR y HOMA-β.

<b>HOMA-IR = <math>\frac{\text{Glucosa} \times \text{Insulina}}{22.5}</math></b>	<b>HOMA-IR = <math>\frac{\text{Glucosa} \times \text{Insulina}}{405}</math></b>
<b>Glucosa:</b> mmol/L <b>Insulina:</b> μU/mL	<b>Glucosa:</b> mg/dL <b>Insulina:</b> μU/mL
<b>HOMA- β % = <math>\frac{20 \times \text{Insulina}}{\text{Glucosa} - 3.5}</math></b>	<b>HOMA-β % = <math>\frac{360 \times \text{Insulina}}{\text{Glucosa} - 63}</math></b>
<b>Glucosa:</b> mmol/L <b>Insulina:</b> μU/mL	<b>Glucosa:</b> mg/dL <b>Insulina:</b> μU/mL

Los modelos HOMA han demostrado ser una herramienta clínica y epidemiológica en las descripciones de la fisiopatología de la diabetes. Se ha utilizado ampliamente y se ha convertido en un método fisiológico clínico. El análisis HOMA permite la evaluación de inherente de la función de la célula β y la sensibilidad a la insulina [50, 53, 54].

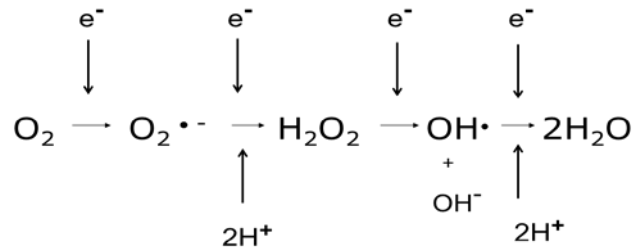
## 2.8 Estrés oxidante en la diabetes

La DM es un grupo de trastornos metabólicos caracterizado por niveles elevados de glucosa en la sangre (hiperglucemia). Debido a esta hiperglucemia, existen otros factores que desempeñan un papel importante en la patogénesis de la diabetes como la hiperlipidemia y el EO involucrados en las complicaciones de la enfermedad [56-58]. La formación de radicales libres (RL) por glicación de proteínas, la oxidación de glucosa y el aumento de LPO daña a las enzimas antioxidantes, a la maquinaria celular e incrementa la RI [56].

En la DM, el principal origen de EO es la mitocondria. Durante el metabolismo oxidante en la mitocondria, se producen diferentes ERO [59]. Por un lado, las ERO se producen para ejercer una función fisiológica en respuesta a la insulina y por otro lado, las ERO también tienen una regulación negativa sobre la señalización de insulina desarrollando RI, siendo un factor de riesgo para DM2 [56].

El EO es causado por un desequilibrio entre la producción de ERO y/o radicales libres y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Entre las especies reactivas se encuentran las de oxígeno y/o nitrógeno incompletamente reducido por lo que son más reactivas que sus formas moleculares. Los RL, en cambio, pueden ser definidos como moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones no apareados en sus órbitas moleculares, por lo que incrementa considerablemente su grado de reactividad [60].

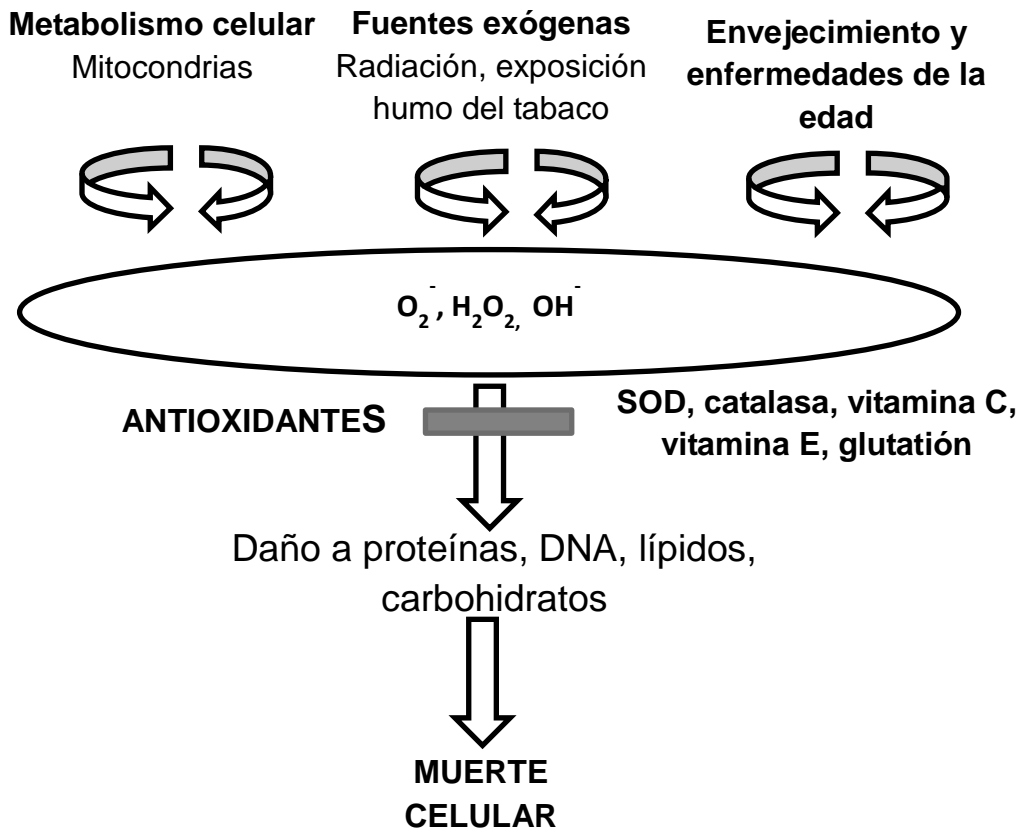
Se ha demostrado el papel tóxico del oxígeno, el cual se debe a la formación de las ERO. La toxicidad del oxígeno, radica en que a partir de este se generan especies mucho más reactivas en la cadena de transporte mitocondrial donde ocurre la transferencia de electrones conocida como reducción univalente del oxígeno (Reacción 1). Las principales ERO son el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y el singulete de oxígeno ( $^1O^2$ ) [60-63].



**Reacción 1.** Reducción univalente del oxígeno. Mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón, con formación de radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final de la reducción.

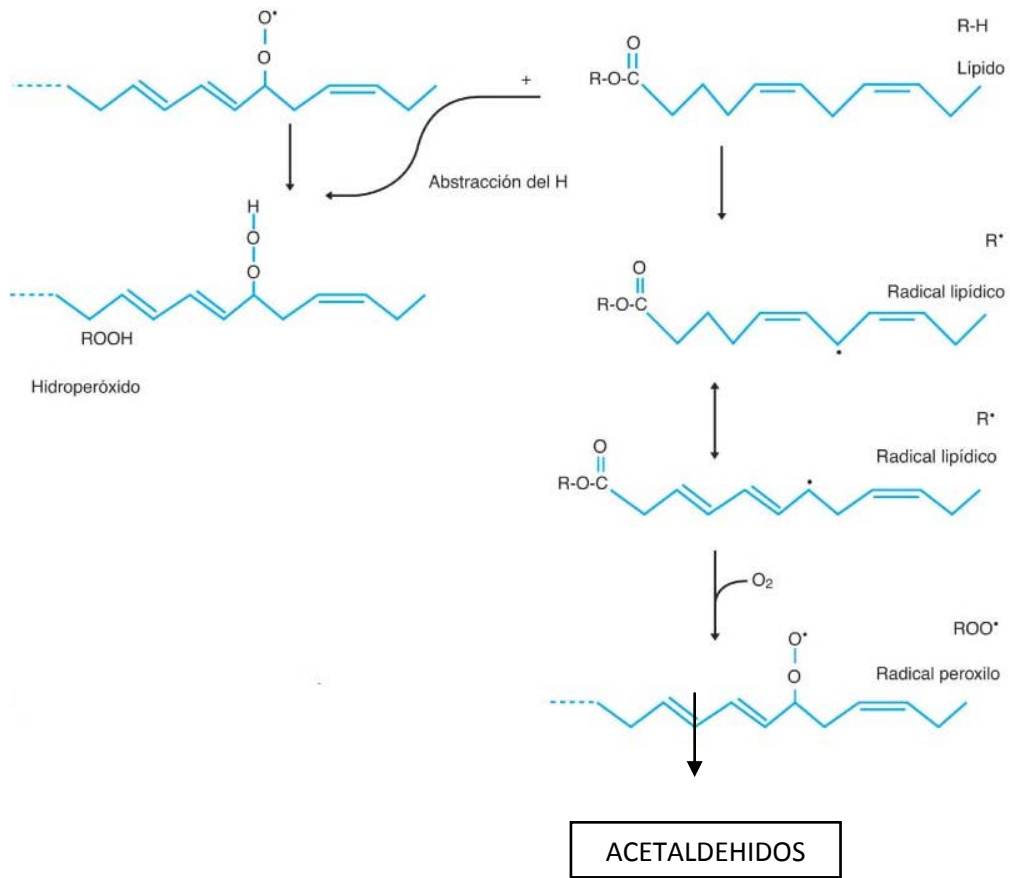
Las especies reactivas en las concentraciones adecuadas son esenciales para diversos procesos biológicos, como la regulación transcripcional dependiente del estado redox, transporte de iones y fosforilación de proteínas [62]. La mitocondria es la principal fuente de ERO, en donde el anión superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), y el peróxido de hidrogeno  $H_2O_2$  se producen en células aeróbicas durante la respiración mitocondrial [63]. Bajo condiciones de EO, las 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 daño oxidante [60-63].

Las ERO, se forman durante procesos biológicos normales por las células como subproductos de las cadenas de electrones o son producidos específicamente para cumplir funciones, entre las que se encuentran oxidación de xenobióticos. El desequilibrio de mayor generación de ERO puede deberse a una disfunción de la mitocondria por fuentes exógenas, envejecimiento y/o enfermedades relacionadas de la edad [60-63] (Figura 5).

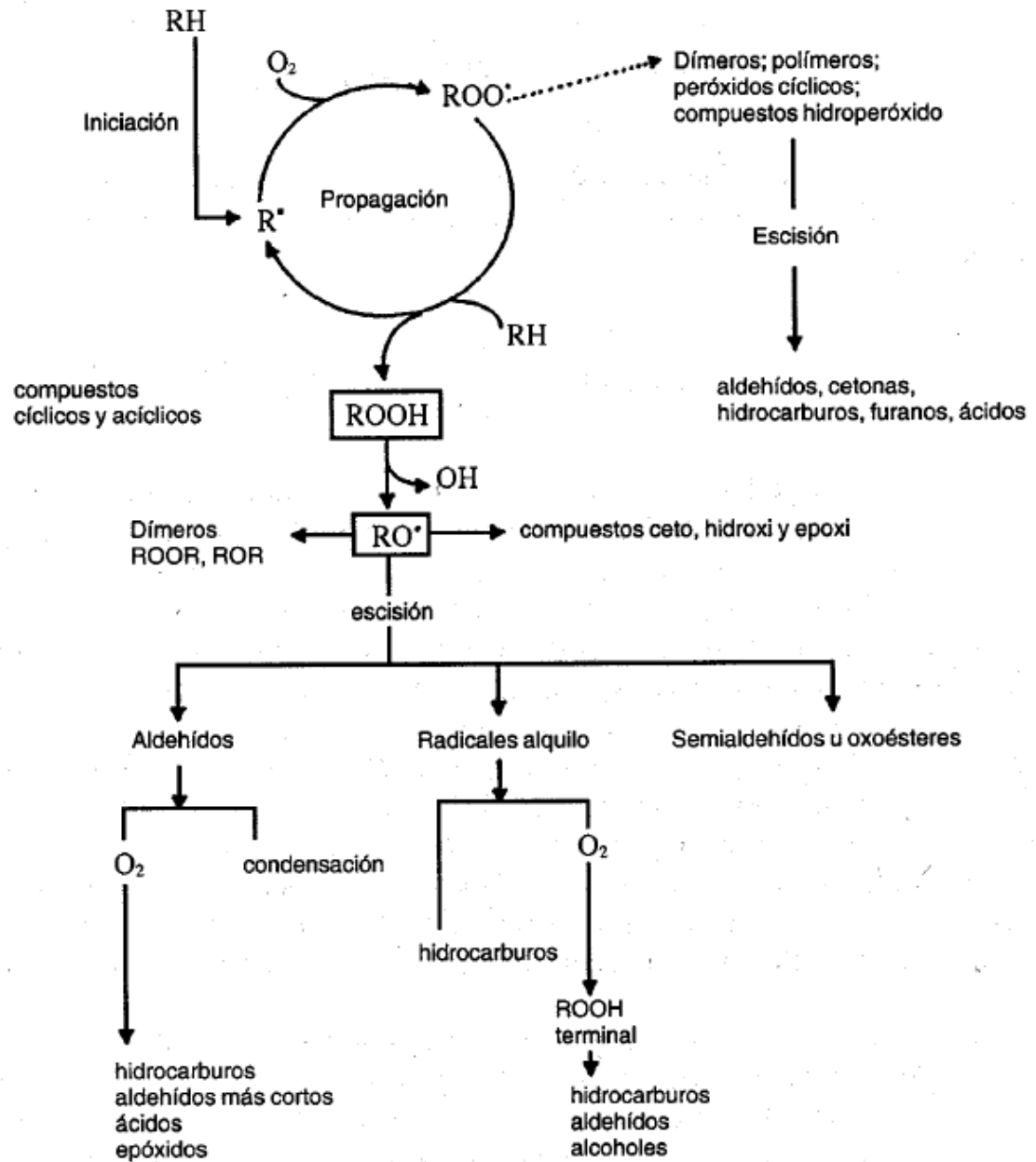


**Figura 5.** Fuentes de estrés oxidante. Principales especies reactivas de oxígeno ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$ ) y enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), y catalasa (CAT) [60].

Estas ERO pueden causar un daño celular por LPO, inactivación de enzimas con grupos sulfhidrilo, entrecruzamiento, oxidación de proteínas y alteración del ácido desoxirribonucleico (ADN), produciendo una alteración en la función celular o incluso la muerte. Asimismo, se ha demostrado que no sólo las ERO son responsables de la RI; si no que también los productos secundarios de la LPO están involucrados, proceso en el cual se derivan aldehídos reactivos tóxicos, tales como el malondialdehído (MDA), acetaldehído, y 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE) (Figura 6, 7). Los aldehídos tóxicos pueden formar aductos con proteínas, conduciendo a daño celular y disfunción de órganos [60-63] .



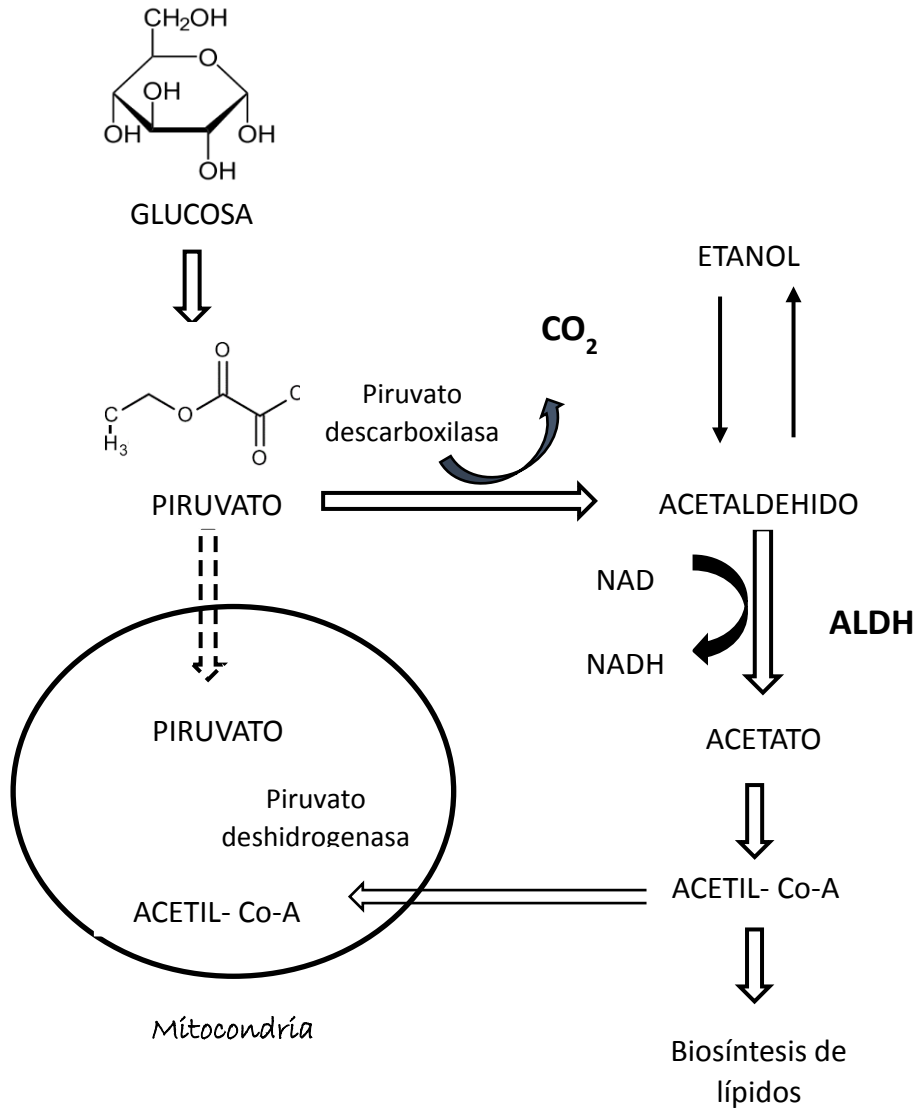
**Figura 6.** Mecanismo de inicio de LPO [60-63].



**Figura 7.** Modificación oxidante de lípidos [159].

Las ERO continuamente se están produciendo en estados de hiperglucemia y la incapacidad de manejar estas ERO permite un aumento de EO y daño celular. Las ERO contribuyen a la resistencia a la insulina, debido a que interfiere con las vías de señalización inducida por esta hormona y evitan la traslocación del transportador de glucosa GLUT 4 a la membrana plasmática. Como se mencionó anteriormente, este EO está acoplado a la degradación oxidativa de las membranas lipídicas, también conocida como LPO. Este proceso genera más de 200 tipos de aldehídos, muchos de los cuales son reactivos y tóxicos. Las ALDHs metabolizan aldehídos tanto endógenos como exógenos mitigando el EO generado por la hiperglucemia y LPO actuando como atrapador de durante la LPO (Figura 8) [64-65]. En condiciones de hiperglucemia las ERO se generan principalmente durante la autooxidación de la glucosa y en diferentes reacciones oxidativas que acompañan a la glicación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.





**Figura 8.** Participación de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) en estados de hiperglucemia.

Actualmente se reconoce que el EO está involucrado en la RI y de manera importante en la patogénesis de la DM2.

## 2.9 Mecanismos generales de EO en el desarrollo de la diabetes

Los mecanismos propuestos por los cuales las especies reactivas contribuyen al desarrollo de DM2, dependen en gran manera de las células en donde se produzca el daño y la maquinaria endógena antioxidante. Se pueden enlistar tres mecanismos generales por los cuales las ERO contribuyen al desarrollo de la 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 adenosina trifosfato (ATP) por medio de la fosforilación oxidativa. Algunas funciones adicionales incluyen la generación y desintoxicación de ERO, la participación en algunas formas de apoptosis, la regulación del calcio citoplásmico y de la matriz mitocondrial, la síntesis y el catabolismo de los metabolitos. Alguna anomalía en cualquiera de estos procesos puede ser denominado disfunción mitocondrial [66].

En la cadena transportadora de electrones, se ha observado un incremento de producción de anión superóxido [67]. Los radicales superóxido se reducen a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en la mitocondria por la acción de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial. Posteriormente, el  $H_2O_2$  es reducido a agua por la acción de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa.

En las células  $\beta$ , los niveles de glutatión peroxidasa y catalasa son muy bajos comparados con los niveles en hígado (99% más bajos) [68]. Cuando la producción de  $H_2O_2$  es mayor que la capacidad de reducirlo, se acumula y se produce el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), vía reacción de Fenton [69]. Si no se eliminan rápidamente las especies pueden producir hipertrofia de la mitocondria, además de promover fragmentación de ADN, la nitración de proteínas, la peroxidación de los fosfolípidos de membrana y promover la apoptosis [70].

Se ha documentado que la producción de  $H_2O_2$  en mitocondrias de músculo esquelético, promueve la RI. En tejidos de animales con RI, inducida por una dieta alta en grasas, y en biopsias de sujetos con obesidad mórbida, el desarrollo de RI 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 la insulina [71].

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

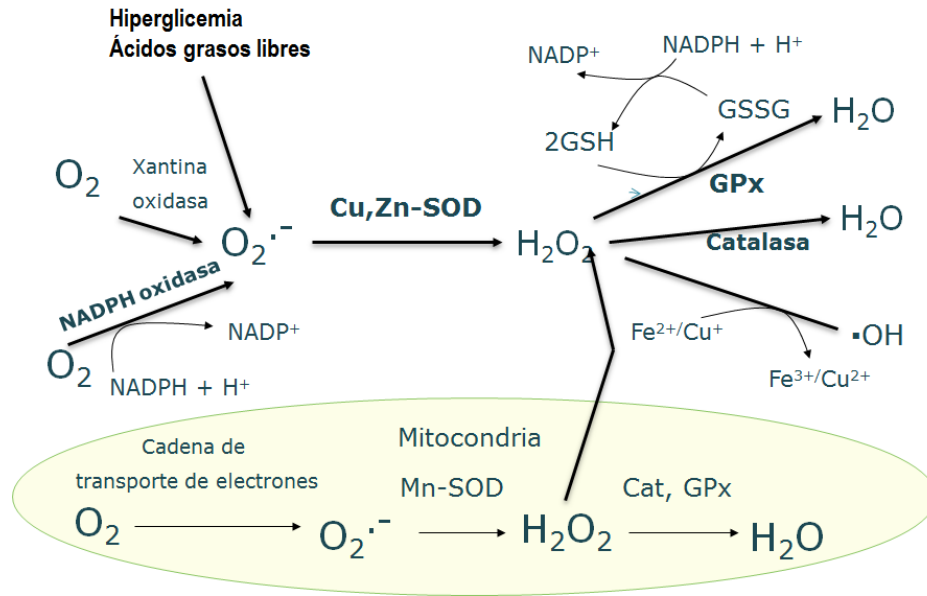
Las oxidasas dependientes de NADPH (Nox), son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH), hasta el oxígeno molecular para generar el radical superóxido en el medio extracelular.

Estas enzimas contribuyen a numerosos procesos biológicos y patológicos que incluyen la audición y el equilibrio, la regulación de la presión arterial, la inflamación, el crecimiento vascular y algunas isoformas 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 [72, 73] y la generación de especies reactivas modula la secreción de insulina estimulada por glucosa [74, 75].

### **c) Disminución de los mecanismos antioxidantes**

Ante un estado de EO, se activa el sistema de defensa antioxidante. Definiendo antioxidante como cualquier sustancia que retarde, prevenga o remueva el daño oxidante a una molécula blanco [42], siendo capaces de transformar estas ERO a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), impidiendo su formación o que puedan ser metabolizadas a especies menos reactivas.

El sistema antioxidante consta de antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. El primero de éstos lo constituye un complejo de enzimas especializadas denominadas enzimas antioxidantes (Figura 9).

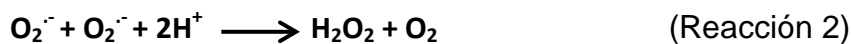


**Figura 9.** Mecanismos de defensa antioxidante SOD, GPx, CAT.

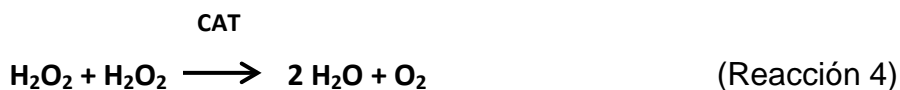
La superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1), cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Considerada la primera enzima de defensa antioxidante debido a que previene la formación del radical hidroxilo (Reacción 2). El radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) se forma por la reacción de Fenton 1984 [69] (Reacción 3), cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se reduce con metales de transición como el hierro o el cobre aceptando un electrón no apareado.

Este radical es considerado como el oxidante más potente en los sistemas biológicos debido a que reacciona de manera más rápida con casi todas las moléculas biológicas.

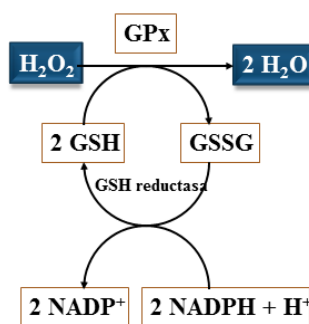
SOD



Con la dismutación del superóxido se obtiene otra especie reactiva de oxígeno, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; el cual es metabolizado por la catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) (Reacción 4) y glutatión peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9) (Figura 9) a agua y oxígeno [76,77].



La Glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de hidroperóxidos en presencia de glutatión reducido [77]. Mientras que la glutatión reductasa (GR) mantiene el nivel de GSH en la célula (Figura 10).



**Figura 10.** Acción de la enzima glutatión peroxidasa.

Otras enzimas como la hemo oxigenasa (HO), la tiorredoxina reductasa (Trx-R), la tiorredoxina peroxidasa (Trx-P) [60] y la aldehído deshidrogenasa (ALDH) [76], también son denominadas enzimas antioxidantes, debido a que su acción disminuye sustratos que causan estrés oxidante.

Por otro lado, los antioxidantes no enzimáticos poseen la capacidad de interaccionar de manera directa con las ERO y/o radicales libres. Corresponden a un conjunto de compuestos capaces de donar electrones, reaccionando directamente con radicales o pro oxidantes. Estos compuestos pueden proteger contra el estrés oxidante previniendo el daño celular. Entre los antioxidantes endógenos tenemos al glutatión, alfa-ceto-ácidos, bilirrubina, grupos sulfhidrilos, ácido lipoico, CoQ 10, tiorredoxina, melatonina, ácido úrico y melanina entre otros. También existen compuestos que son

tomados de la dieta y que tienen propiedades antioxidantes como la vitamina C, vitamina A, vitamina E, carotenoides y fenoles de las plantas [60-62].

En la DM2 se han observado disminuciones concomitantes del cofactor NADPH y del antioxidante endógeno glutatión (GSH), lo que conlleva a un desbalance del estado redox y disminución de enzimas antioxidantes [78, 79]. También se ha observado un incremento en la LPO de membranas cuya producción es directamente proporcional a la concentración de glucosa en sangre y hemoglobina glucosilada [80], la insulina tiene un efecto antioxidante para proteger células y órganos en contra del daño causado por EO. Previene de la muerte por necrosis y apoptosis causadas por especies reactivas en varios tipos celulares como hepatocitos, células  $\beta$ , células neuronales y endoteliales [81].

## **2.10 Estrés oxidante y el desarrollo de complicaciones en la diabetes**

La diabetes es un trastorno metabólico donde se presentan complicaciones. Las complicaciones pueden ser macrovasculares (enfermedad coronaria, y enfermedad vascular periférica), microvasculares (neuropatía, retinopatía y nefropatía) o ambas tanto micro como macro vasculares (pie diabético). La mortalidad y morbilidad de la diabetes se encuentran más asociadas con la degeneración macrovascular en comparación con los riesgos de las complicaciones microvasculares en personas adultas [82].

En general, las complicaciones de la DM pueden ser clasificados en complicaciones metabólicas agudas que incluyen hipoglucemia, cetoacidosis y coma hiperosmolar no cetónico y complicaciones sistémicas crónicas que incluyen nefropatía diabética, microangiopatía, retinopatía y aterosclerosis.

El EO puede originarse de diferentes fuentes y se ha documentado que las ERO se producen en mayores cantidades en los islotes de pacientes con DM2 [83]. Aunado a esto, la obesidad, la hipertensión, las dislipidemias y la hiperglucemia se asocian con el incremento de ERO que incrementan el riesgo de padecer complicaciones micro y macro vasculares [84].

Las fluctuaciones en las concentraciones de glucosa son la principal causa de disfunción endotelial en diferentes órganos incluidos los eritrocitos, debido a que inducen mayor producción de radical superóxido y  $H_2O_2$ , provocando disminución del sistema antioxidante y daño molecular [88]. Los mecanismos por los cuales la producción aumentada de especies reactivas puede causar daño se resumen en los siguientes puntos [86-88].

- a) Activación de la vía de los polioles: Bajo una serie de reacciones se obtiene fructosa a partir de glucosa, por medio de la enzima aldosa reductasa. Esta vía consume NADPH, el cual queda menos disponible para el metabolismo de glutatión [87-88].
- b) La formación incrementada de productos finales de glucosilación avanzada, a partir de la reacción no enzimática de la glucosa con proteínas. El receptor de las proteínas glucosiladas induce la producción de superóxido vía activación NADPH oxidasas y a su vez pueden activar factores de inflamación causando cambios morfológicos a nivel celular [87-88].
- c) Activación de la proteína cinasa C (PKC): Algunas isoformas de PKC pueden activar la producción de óxido nítrico en células del musculo liso en induce la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular, aumentando o disminuyendo la permeabilidad vascular.
- d) Activación de la vía de hexosaminas: La RI y la hiperglucemia 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 [87-88].

Estas vías tienen en común que el EO 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 un blanco para prevenir el desarrollo de resistencia a la insulina, la disfunción de las células  $\beta$  y las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes, al incrementar la expresión de toda una maquinaria de enzimas antioxidantes en diferentes tipos celulares [87-88].

## **2.11 Aldehído deshidrogenasa**

Las enzimas aldehído deshidrogenasas (EC 1.2.1.3), son una familia de enzimas con un papel en la desintoxicación de aldehídos, que se acumulan a través del metabolismo y de los que estamos expuestos desde el medio ambiente. Los niveles excesivos de aldehídos tóxicos se disminuyen por la participación de la ALDH. La enzima ALDH mitocondrial, ha sido bien establecida por su papel permisivo en el metabolismo de etanol y acetaldehído, Figura 10 [11-12].

Los aldehídos se forman normalmente del catabolismo, a partir de aminoácidos, lípidos y nucleótidos. Como también, los aldehídos y sus precursores están presentes en los alimentos. El etanol es un precursor de acetaldehído, otros aldehídos se encuentran en fermentados de frutas y vegetales. Aunado a esto, los aldehídos también están presentes en nuestro medio ambiente en una variedad de aromas y perfumes, en el humo del cigarrillo, en el escape de los automóviles, y en una variedad de productos químicos y contaminantes [89].

Asimismo, los aldehídos se generan a partir de una amplia variedad de precursores endógenos y exógenos durante numerosos procesos fisiológicos considerados enzimáticos como no enzimáticos. Se conoce que uno de los generadores más prominentes de aldehídos es a través de mecanismos no enzimáticos y la autooxidación de ácidos poliinsaturados, incluyendo el ácido araquidónico y el ácido linoleico [12-89].



La superfamilia de ALDH en humanos, comprende 19 isoenzimas que poseen funciones fisiológicas y toxicológicas. Se ha observado en varios estudios que la enzima ALDH protege en contra de la citotoxicidad inducida por un aldehído [11] catalizando el NAD (P)<sup>+</sup> dependiente de la oxidación irreversible de un amplio espectro de aldehídos endógenos y exógenos. Muchas isoenzimas ALDH son importantes, debido a que oxidan aldehídos reactivos derivados de la LPO y de ese modo ayudan a mantener homeostasis en la célula [11, 90].

La estructura de la enzima ALDH es tetramérica y comprende aproximadamente 500 residuos de aminoácidos dependiendo de la isoforma. Contiene 3 dominios [11], dos de ellos se enlazan al dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) y un dominio beta de tres cadenas pequeñas, el cual está implicado en las interacciones de las subunidades en esta enzima. Las proteínas ALDH se encuentran en diferentes regiones subcelulares como citosol, mitocondrias, retículo endoplasmático y núcleo y presentan diversas isoformas como la ALDH1 presente en diversos órganos, incluyendo testículos, cerebro, cristalino, retina, hígado, riñón, pulmón, y eritrocitos.

La ALDH2 se expresa constitutivamente en una variedad de tejidos como el hígado, riñón, corazón, pulmón, cerebro. Es la principal enzima implicada en la oxidación del acetaldehído durante el metabolismo del etanol (Figura 9).

La ALDH3 presente constitutivamente en diversos tejidos, incluyendo en la córnea, estómago, esófago y pulmón. La disfunción de estas enzimas puede contribuir a una variedad de padecimientos, incluyendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cerebrovasculares, cáncer y diabetes.

## 2.12 Aldehído deshidrogenasa y diabetes

Leslie y Pike; 1978 [91-92] sugirieron, que la clorpropamida (fármaco hipoglucemiante de la familia de las sulfonilureas), tomada antes como tratamiento para el consumo de alcohol, provocó enrojecimiento en la cara de pacientes con DM no insulino dependiente (DMNID) en una población caucásica. Este efecto fue específico para clorpropamida, y en un estudio en el que los pacientes recibieron primero un placebo en lugar de clorpropamida antes de su consumo de alcohol, no se observó. Los efectos de enrojecimiento por clorpropamida no se produjeron en los diabéticos insulino dependientes. Aunque clorpropamida ya no se utiliza clínicamente, en el 2001, se encontró que la clorpropamida inhibe la ALDH, lo que sugiere una posible relación entre la diabetes y la ALDH.

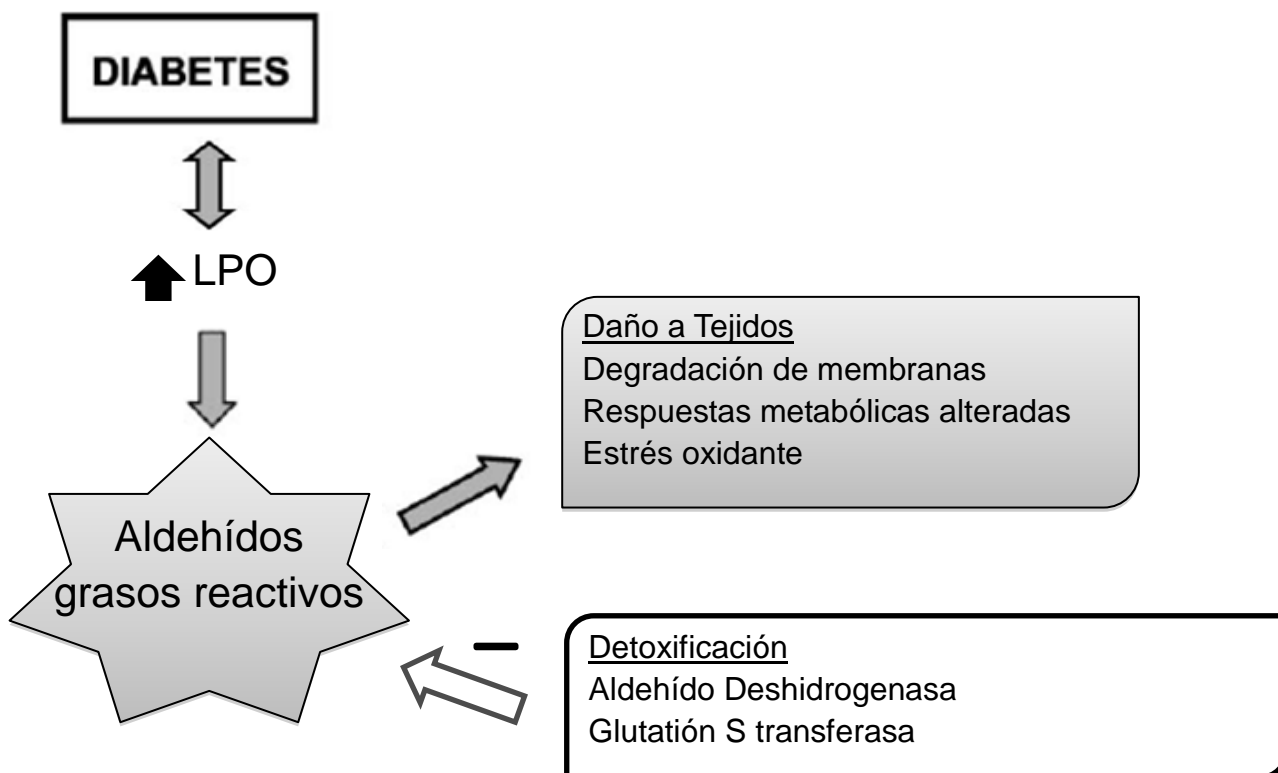
Otro estudio documentó, la correlación entre el etanol y la diabetes concluyendo que los sujetos con un genotipo ALDH2 normales, el consumo de etanol mayor de 20 bebidas por semana podía aumentar la RI [93]. También la ALDH2 fue mayor para aquellos diabéticos que bebieron una moderada cantidad de etanol en comparación con los que no bebieron [94]. Estos estudios conducen determinar si la ALDH2, independiente del consumo de alcohol, es un factor de riesgo para la diabetes [95- 96].

Los estudios en ratas, han demostrado que la actividad ALDH2 puede afectar a la patología diabética. Además, se ha observado en ratones transgénicos que la sobreexpresión de ALDH2 es protectora contra la miocardiopatía diabética inducida por estreptozotocina por lo que se sugiere una asociación entre la diabetes y la actividad de la enzima ALDH2 [97, 98].

Muchas enfermedades se asocian con aumento de aldehídos. De hecho, las TBARS y la medición de aldehídos en sangre, era una prueba clínica estándar para determinar la inflamación y otros factores de estrés en general, que se correlacionaba con la gravedad de muchas enfermedades en humanos [97-101].

Igualmente se ha observado que durante la progresión de la DM2, la hiperglucemia resultante promueve la generación de ERO que contribuyen al

desarrollo de las complicaciones diabéticas. Se ha sugerido que la generación de ERO induce LPO y los productos resultantes son aldehídos reactivos como los 4-HNE que contribuyen a la progresión y desarrollo de esta patología donde participa la ALDH detoxificando los aldehídos [10,101]. (Figura 11).



**Figura 11.** Participación de ALDH en diabetes.

Por último, se observó que la actividad de la ALDH fue mayor en sangre de pacientes con DM2 [102], indicando que esta enzima proporciona una importante protección contra el EO y la detoxificación de aldehídos.

Así, estudios clínicos con respecto a la ALDH se han enfocado en el estudio de la asociación de los polimorfismos en la diabetes y el metabolismo del alcohol. Estos estudios dejan claro la asociación de ALDH con diabetes, sin embargo sería útil conocer la asociación de la actividad en la DM2 para determinar su utilidad [103-105].

## 2.13 Tratamiento de la Diabetes mellitus Tipo 2

La dieta y un programa de ejercicio regular son los pilares fundamentales del tratamiento de la DM2. Cuando no se logra un control metabólico aceptable, ya sea porque el paciente no se adapta al cambio de estilo de vida, o bien porque, a pesar de cumplir la dieta y realizar ejercicio de forma regular, no se alcanzan los objetivos terapéuticos, debe iniciarse tratamiento farmacológico [106].

Los objetivos de control glucémico se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Objetivos de control glucémico.

<b>Criterio</b>	
HbA1c	< 7%
Glucemia basal y preprandial	70-130 mg/dl ó 3.8 - 7.2 mmol/L
Glucemia postprandial	<180 mg/dl ó 10 mmol/L

[18]

Para seleccionar un fármaco hipoglucemiante en una persona con DM2 deben tenerse en cuenta las características del medicamento, mecanismo de acción, efectividad, potencia, efectos secundarios, contraindicaciones y costos [107].

- La metformina es la única biguanida disponible y se debe considerar como el fármaco de administración oral de primera línea en todas las personas con DM2 y en particular en las que tienen sobrepeso clínicamente significativo ( $IMC \geq 27 \text{ m}^2$ ).
- Las sulfonilureas se pueden considerar como fármaco hipoglucemiante oral de primera línea en personas con peso normal o que tengan contraindicación a la metformina.
- Las meglitinidas se pueden considerar como alternativa a las sulfonilureas cuando el riesgo de hipoglucemia puede empeorar comorbilidades, aunque el costo es mayor.
- Las tiazolidinedionas se pueden considerar como alternativa a la metformina en personas con sobrepeso, aunque puede haber un incremento moderado del mismo y el costo es mayor.
- La acarbosa es el inhibidor de las alfa glucosidasas de mayor disponibilidad. Su efectividad para reducir la hiperglucemia es inferior a la de los demás hiperglucemiantes de administración oral por lo cual solo se debe considerar como monoterapia en pacientes con elevaciones leves de la glucemia, especialmente postprandial.

### 2.13. 2 Características de los fármacos hipoglucemiantes

- Metformina (biguanidas): su mayor efecto es a nivel hepático inhibe la gluconeogénesis, tiene un importante efecto sensibilizador de la insulina a nivel periférico y las personas que la toman ganan menos peso que con los otros antidiabéticos orales, los efectos secundarios es que produce intolerancia gastrointestinal, especialmente si no se tiene cuidado en dosificarla gradualmente, sin embargo, la intolerancia puede presentarse meses o años después, está contraindicada en presencia de insuficiencia renal o hepática y en alcoholismo, porque se puede producir acidosis láctica.
- Sulfonilureas: tienen su principal efecto como secretagogos de insulina, aunque algunas de última generación como la glimepirida y la glicazida tienen efectos adicionales favorables sobre el sistema cardiovascular, la función endotelial y la célula beta. Su principal efecto secundario es hipoglucemia, aunque es menos frecuente con la última generación y en particular con las de acción prolongada que se administran una vez al día, muy rara vez se pueden presentar reacciones cutáneas, hematológicas o hepáticas, y entre sus contraindicaciones se encuentra el uso de la glibenclamida, en presencia de falla renal, porque sus metabolitos hepáticos conservan acción hipoglucemiante.
- Meglitinidas: tienen su principal efecto como secretagogos de insulina, su principal efecto secundario es la hipoglucemia aunque se presenta menos que las sulfonilureas, por tener una acción más corta, rara vez se pueden presentar reacciones gastrointestinales.

- Tiazolidinedionas: tienen su principal efecto como sensibilizadoras de la insulina, aunque cada vez se encuentran más efectos antiinflamatorios y antiaterogénicos derivados de su acción sobre las citoquinas producidas por el tejido adiposo. El efecto sobre lípidos es variable, su principal efecto secundario es el edema (especialmente en combinación con insulina) y la ganancia modesta de peso. Están contraindicadas en pacientes con insuficiencia cardíaca severa.
- Inhibidores de alfa-glucosidasas: Su principal efecto es la inhibición parcial de la absorción de disacáridos, por lo cual retardan la absorción postprandial de carbohidratos, su principal efecto secundario es la flatulencia, especialmente si no se tiene cuidado en dosificarla gradualmente. Bloquea la absorción de disacáridos como el azúcar, por lo cual en el caso de hipoglucemia se debe ingerir solo glucosa [107].
- Insulina: Una persona con DM2 requiere insulina cuando no logra alcanzar la meta de control glucémico con el uso adecuado y suficiente de los antidiabéticos orales disponibles, lo que indica que tanto su producción como su reserva de insulina se han reducido a un nivel crítico y la célula beta no responde al estímulo de los fármacos con acción secretagoga [107]. Su principal función es mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango entre  $\leq 99$ mg/dl favoreciendo la entrada y almacenamiento de la glucosa en músculo y tejido adiposo. En hígado se favorece su almacenamiento e inhibe su producción.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, la DM2 constituye un grave problema de salud pública por la magnitud, trascendencia de sus complicaciones y costos en México. En los últimos años, debido a los programas de detección oportuna, el número de personas diagnosticadas con diabetes se ha elevado de forma considerable.

Pocos antecedentes se refieren al impacto de las variables implicadas en el desarrollo de EO desde los estados iniciales de desarrollo previo al diagnóstico de DM2, como en el caso de la RI o en la prediabetes que puedan contribuir a describir mecanismos de pronóstico y prevención con adecuado control glucémico.

Existen diferentes antecedentes del papel del EO en la DM2 por lo tanto, la importancia de un buen control glucémico en el tratamiento de la diabetes es incuestionable, siendo deseable evaluar diferentes factores que participen en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad bajo diferentes tratamientos hipoglucemiantes.

Asumiendo que la LPO es consecuencia del EO, la actividad de la ALDH es un factor involucrado en el desarrollo de la DM2. Así, la evaluación de la ALDH y otras variables del estado redox bajo tratamiento hipoglucemiante y control glucémico, permitirá la búsqueda de nuevos blancos predictores además, de una mejor descripción de la enfermedad para establecer estrategias de tratamientos hipoglucemiantes para nuestra población.



## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluación de la actividad de la ALDH y el estatus de estrés oxidante (marcadores de EO y actividades de enzimas antioxidantes) en pacientes con RI y pacientes con DM2 y tratamiento farmacológico hipoglucemiante.

### **4.2. Objetivos particulares**

- a) Establecer la participación del EO en la RI y la GAA mediante la evaluación de la actividad de la ALDH, enzimas antioxidantes y concentraciones de los marcadores de EO.
- b) Establecer la participación del EO en la DM2 con y sin tratamiento farmacológico, mediante la evaluación de la actividad de la ALDH, enzimas antioxidantes y concentraciones de los marcadores de EO.
- c) Establecer la participación del EO en la DM2 con tratamiento farmacológico clasificados con y sin control glucémico, mediante la evaluación de la actividad de la ALDH, enzimas antioxidantes y concentraciones de los marcadores de EO.
- d) Establecer la participación del EO en la DM2 sin tratamiento farmacológico clasificados con y sin control glucémico, mediante la evaluación de la actividad de la ALDH, enzimas antioxidantes y concentraciones de los marcadores de EO.
- e) Determinar la asociación de la actividad de la ALDH, enzimas antioxidantes y concentraciones de EO en la RI, GAA, DM2 y DM2 con tratamiento.

## V. HIPÓTESIS

La actividad de la enzima ALDH presente en eritrocitos humanos será mayor y presentará una asociación en pacientes con DM2 y con tratamiento farmacológico hipoglucemiante.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño y población del estudio

El presente estudio fue aprobado por la Facultad de Medicina, UNAM (Proyecto No. 059-2012), los Comités de Ética e Investigación del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos (número de registro 209.2013) y del Hospital General de México (número de registro DI/11/UME/4/46). Todos los participantes firmaron su Consentimiento Informado previamente a cualquier procedimiento del estudio y fueron reclutados de las siguientes instituciones:

- 1) Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos (HRLALM) del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los trabajadores del Estado (ISSSTE).
- 2) Clínicas de Medicina Familiar del ISSSTE de la zona sur de la Ciudad de México (el Valle, Fuentes Brotantes, Ignacio Chávez y Xochimilco).
- 3) Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

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

#### **A) Criterios de inclusión**

##### **1) Grupo normoglucémicos (NG):**

- ✓ Hombres y mujeres sin diagnóstico previo de cualquier tipo de diabetes con edad  $\geq 35$  años.
- ✓ Glucosa sérica en ayunas  $\leq 99$  mg/dl.
- ✓ HOMA-IR  $< 2.7$ .

**2) Grupo normoglucémicos con resistecia a la insulina (NG RI):**

- ✓ Hombres y mujeres sin diagnóstico previo de cualquier tipo de diabetes con edad  $\geq 35$  años.
- ✓ Glucosa sérica en ayunas  $\leq 99$  mg/dl.
- ✓ HOMA-IR  $\geq 2.7$

**3) Grupo con glucosa alterada en ayunas (GAA):**

- ✓ Hombres y mujeres sin diagnóstico previo de cualquier tipo de diabetes con edad  $\geq 35$  años.
- ✓ Glucosa sérica en ayunas entre 100 y 125 mg/dl.

**4) Grupo con DM2**

- ✓ Hombres y mujeres con edad  $\geq 35$  años.
- ✓ Con diagnóstico previo de DM2 o glucosa sérica en ayunas  $\geq 126$  mg/dl.

**B) Criterios de exclusión**

- ✓ Pacientes con diabetes tipo 1, gestacional u otro tipo.
- ✓ Mujeres embarazadas o amamantando.
- ✓ Sujetos con eritrocitemia o anemia.
- ✓ Sujetos con nefropatía diabética.
- ✓ Que no aceptaran participar en el estudio o no firmen su consentimiento.

**C) Criterios de eliminación**

- ✓ El no contar con historia clínica completa y/o resultados completos de laboratorio

## 6.2 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra aleatoria (n) estuvo determinada por la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N-1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Esta fórmula se utiliza cuando la población es finita, es decir conocemos el total de la población y deseamos saber cuántos del total tendremos que estudiar [114].

Donde:

**N**= Total de la población con DM2. En este caso de acuerdo al Censo de población y Vivienda, 2010 D.F. 8,595130.

**Z<sub>α</sub><sup>2</sup>** = nivel de fiabilidad de 95% (valor estándar de 1.96)

**p**= margen de error aceptable 5% (valor estándar de 0.05).

**q**= 1-p (en este caso 1-0.05= 0.95)

**d**= precisión (5%= 0.05)

Por lo tanto:

$$\begin{aligned} n &= \frac{(8595130) * (1.96)^2 * 0.05 * 0.095}{(0.05^2 * 8595130 - 1) + (1.96)^2 * 0.05 * 0.95} \\ &= 73 \end{aligned}$$

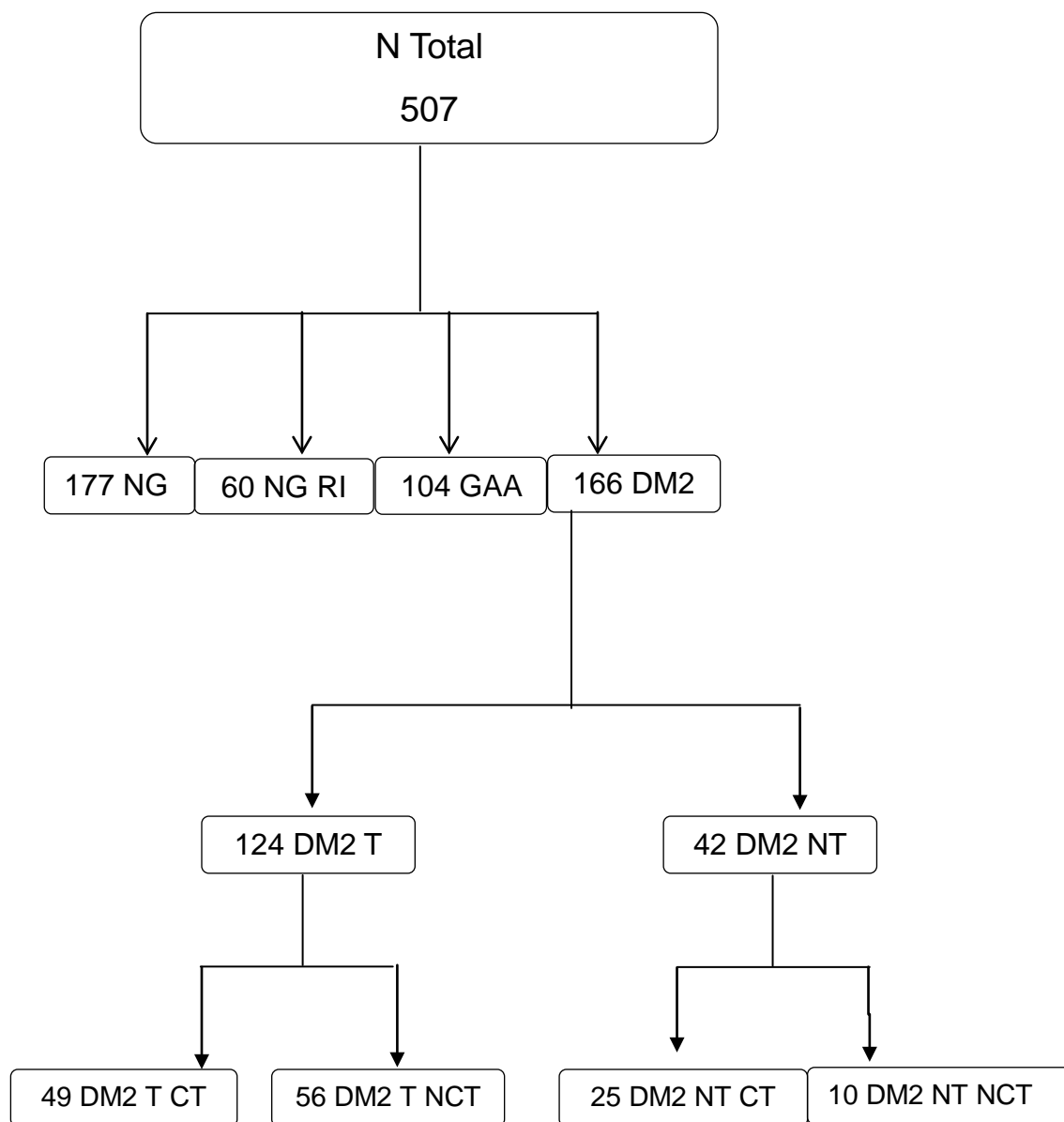
Así, el tamaño de la muestra debía ser al menos de 73 pacientes con DM2.

La muestra poblacional total fue de 500 sujetos. El Grupo NG (n=17), grupo NG RI (n= 60), GAA (n= 104), grupo de pacientes con DM2 (n= 157).

El grupo de pacientes con DM2, se clasificó con (n=119) y sin (n=40) tratamiento farmacológico hipoglucémico. Los grupos con y sin tratamiento

hipoglucémico se clasificaron en control y no control glucémico de acuerdo a la HbA1c  $\geq 7\%$ . Algunos pacientes no se tomaron en cuenta en el control glucémico debido a que no se tenía el resultado de la HbA1c.

De esta manera, el tamaño de la muestra para estos ensayos se ajustó como se describe en el Diagrama 1.



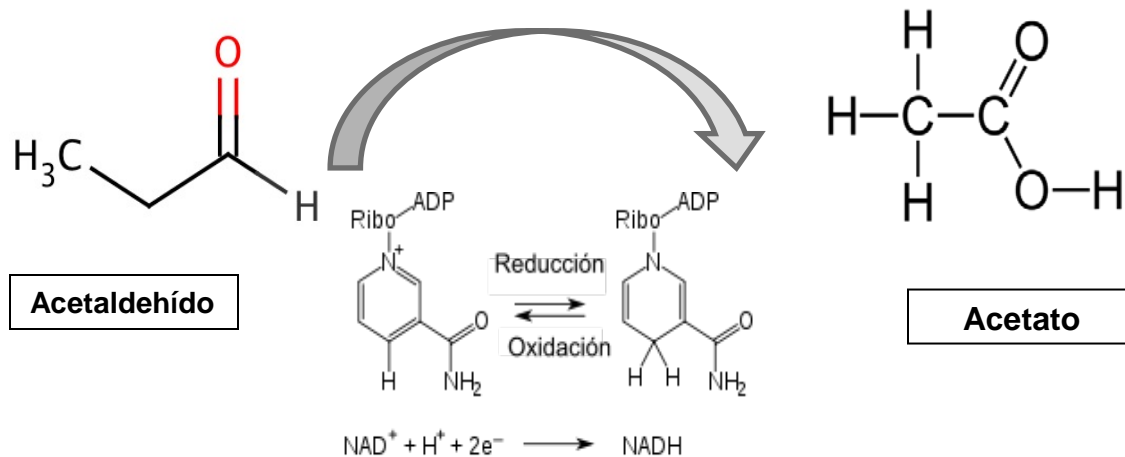
**Diagrama 1.** Tamaño de la muestra en cada etapa del estudio. NG: normoglucémicos, NG RI: normoglucémicos con RI, GAA: glucosa alterada en ayunas, DM2: Diabetes mellitus tipo 2, DM2 T: diabetes mellitus tipo 2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante, DM2 NT: diabetes mellitus tipo 2 sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante, DM2 T CT: diabetes mellitus tipo 2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante y control glucémico, DM2 T NCT: diabetes mellitus tipo 2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante sin control glucémico, DM2 NT CT: diabetes mellitus tipo 2 sin tratamiento hipoglucemiante con control glucémico, DM2 NT NCT: diabetes mellitus tipo 2 sin tratamiento hipoglucemiante sin control glucémico.

### 6.3 Obtención de las muestras y perfil bioquímico clínico

Se obtuvieron dos muestras de sangre periférica (cada una de 6 ml) después de 8-12 h de ayuno. De una muestra se obtuvo el suero para la determinación química sanguínea (glucosa e insulina). Para la cuantificación de HbA1c y de EO se utilizó la otra muestra donde se separaron y lisaron los eritrocitos. Los lisados de eritrocitos se utilizaron para medir la actividad de la ALDH, enzimas antioxidantes y niveles de los marcadores de EO por métodos espectrofotométricos o fluorométricos.

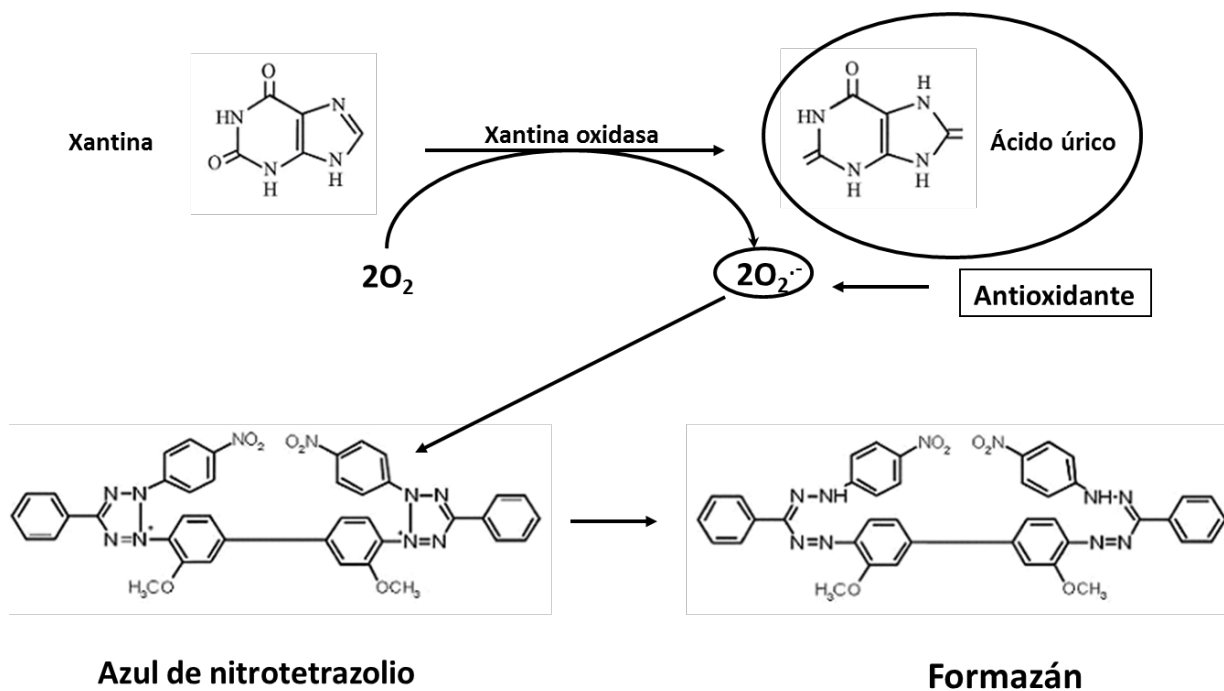
### 6.4 Actividad de las enzimas antioxidantes

La actividad de ALDH (Reacción 5), se determinó por absorbancia en una reacción reductora de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  a  $\lambda$  340 nm por el método de Rawles y col; 1987 [108]. La actividad se calculó con un coeficiente de extinción molar de 6.2 mM/cm para  $\text{NADH}$ . Una unidad de la actividad de la enzima se define como la formación de 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NADH}/\text{min}$  bajo estas condiciones. Todos los ensayos se llevaron en pirofosfato de sodio 0.1 M,  $\text{pH} = 7.4$ , 2.4 mM  $\text{NAD}^+$  como cofactor y acetaldehído 10 mM como el sustrato, la actividad enzimática se expresó como U/mg Hb.



**Reacción 5.** Actividad de la ALDH. Reacción reductora de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  a  $\lambda$  340 nm.

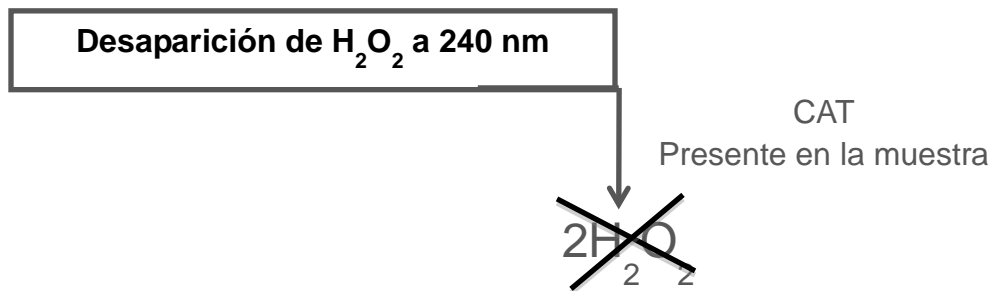
La actividad de SOD (Reacción 6), se midió por el método de Oberley y Spitz, 1984 [109], utilizando el sistema xantina-xantina oxidasa por la generación de anión superóxido y nitroazul de tetrazolio (NBT), como reactivo indicador que se reduce a formazán detectable a 586 nm. Una unidad de SOD, se define como la cantidad de proteína globular que inhibe la reducción de NBT en un 50%. Los datos se expresaron como U/mg de proteína.



**Reacción 6.** Actividad de SOD. Reacción reductora del nitroazul de tetrazolio a formazán a  $\lambda$  560 nm.

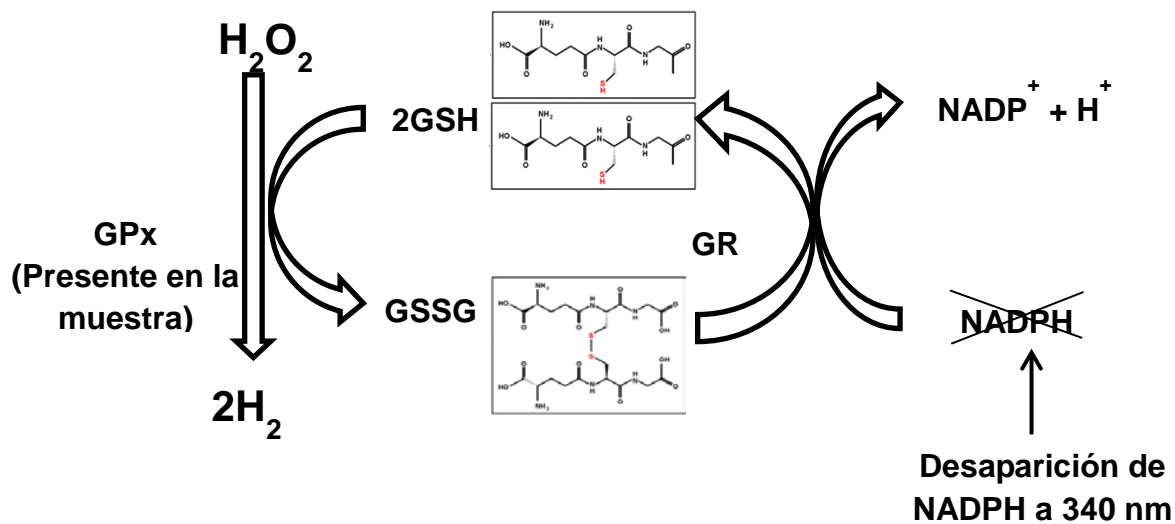
La actividad de CAT (Reacción 7), se determinó de acuerdo al método descrito por Aebi, 1984 [110]; que mide la desaparición de  $H_2O_2$  a 240 nm. Los resultados se expresaron como k/mg de proteína (se usa la constante de reacción de primer orden ( $\kappa$ ) como la unidad de actividad de la catalasa).





**Reacción 7.** Actividad de CAT. Desaparición de  $H_2O_2$  a  $\lambda$  240 nm.

La actividad de GPx (Reacción 8), se evaluó de acuerdo al método descrito por Barrera y col, 2003 [111], usando  $H_2O_2$  como sustrato, medido por la desaparición de NADPH a 340 nm cada minuto durante 3 min. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 mol de NADPH/min. La actividad enzimática se expresó como U/mg de proteína.

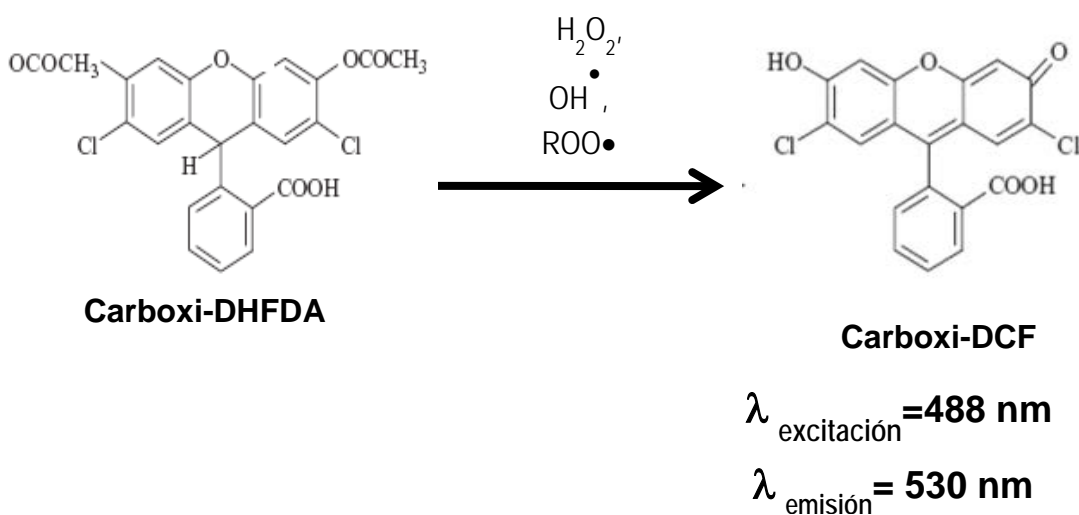


**Reacción 8.** Actividad de GPx. Desaparición de NADPH a  $\lambda$  340 nm.

El contenido de proteína total fue determinado mediante el método colorimétrico descrito por Lowry y col, 1951 [158].

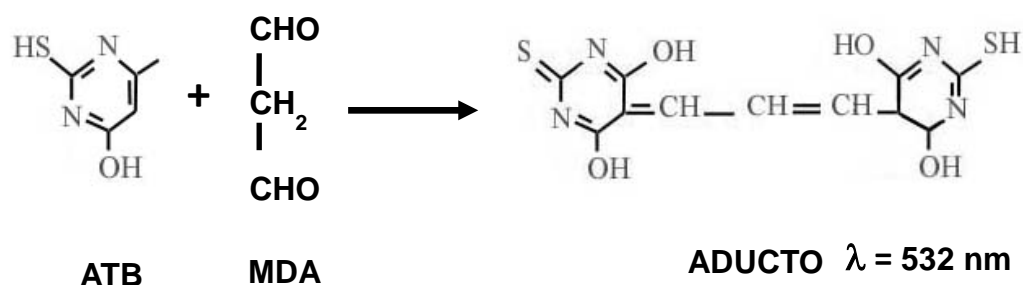
### 6.5 Concentraciones de marcadores de EO.

Las ERO o intermedios de estas se forman por la reducción incompleta de oxígeno. Se determinó por un ensayo fluorométrico descrito por Silva-Adaya y col, 2008 [112], basado en la oxidación de 2-dichlorodihydrofluorescein diacetato (DCFH-DA) a dicloro-fluoresceína (DCF) (Reacción 9) [112]. Las señales fluorescentes se registraron en excitación y de emisión de longitudes de onda de 488 y 530 nm, respectivamente La determinación de DCFH-DA no es fluorescente, pero en presencia de ERO se oxida convirtiéndose en verde fluorescente. Los resultados se expresaron como unidades de Fluorescencia (UF) por proteína.



**Reacción 9.** Concentraciones de ERO. Desaparición de NADPH a  $\lambda$  340 nm.

Se determinó la LPO por medio del ensayo de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Reznick y Packer, 1994 [113]. Los productos de descomposición de ácidos grasos poliinsaturados reaccionan con ácido tiobarbitúrico (ATB) (Reacción 10). Las muestras se detectan espectrofotométricamente a 532 nm y se obtiene el contenido utilizando una curva patrón de tetrametoxipropano y ácido barbitúrico. Los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.



**Reacción 10.** Niveles de TBARS. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico, formando aductos detectables a 532 nm.

## 6.6 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media (mínimo-máximo) o la media  $\pm$  (EEM). Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad, San Diego, EE.UU.). Se determinó la distribución de Gauss por medio de la prueba Shapiro-Wilk. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para variables con una distribución no Gaussiana seguida de una prueba de comparación múltiple propuesta por Dunn. Los análisis de regresión logística [114], se realizaron utilizando el programa STATA 12 (Stata Corp, College Station, TX, EUA) y se ajustaron por edad, género y glucosa. Valores de  $p < 0.05$  se fueron considerados estadísticamente significativos.

## **VII. RESULTADOS**

### **7.1. Características de la población de estudio.**

#### **7.1.1 Características clínicas y antropométricas.**

Para la determinación de la actividad de ALDH y de las variables de EO se incluyó un total de 500 sujetos (edad 35-83 años), 177 sujetos normoglucémicos (NG), 60 sujetos normoglucémicos con RI, 104 pacientes con glucosa alterada en ayunas (GAA) y 166 pacientes con diagnóstico de DM2. Los pacientes con DM2 tuvieron un promedio de evolución de la enfermedad de  $9.4 \pm 7$  años. Se observó mayor participación e inclusión de mujeres de un 60% en la población incluida. Las características de los valores clínicos y antropométricos de cada grupo de estudio se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Características clínicas y antropométricas de los grupos de estudio.

<b>Variables</b>	<b>NG (n= 177)</b>	<b>NG RI (n= 60)</b>	<b>GAA (n= 104)</b>	<b>DM2 (n= 166)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	48 (35-79)	47 (35-76)	50 (35-83)	57 (36-82) <sup>a, b, c</sup>	<0.0001
Masculino, n (%)	87 (49)	33 (20)	45 (43)	74 (47)	-----
Femenino, n (%)	90 (51)	67 (40)	59 (57)	85 (53)	-----
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 (18-43)	31 (22-50) <sup>a</sup>	30 (22-49) <sup>a</sup>	29 (19-45) <sup>a</sup>	<0.0001
PAS (mmHg)	113 (80-160)	115 (90-150)	118 (80-160)	119 (90-160) <sup>a</sup>	<0.0001
PAD (mmHg)	75 (60-100)	76 (60-100)	77 (60-105) <sup>a</sup>	77 (50-100) <sup>a</sup>	0.0091
Glucosa (mg/dL)	89 (63-99)	94 (78-99) <sup>a</sup>	108 (100-125) <sup>a, b</sup>	153 (62-487) <sup>a, b, c</sup>	<0.0001
HbA1c (%)	4.7 (3-6.6)	4.9 (3.7-7.4)	5 (3.8-7.4) <sup>a</sup>	7.3 (4-14) <sup>a, b, c</sup>	<0.0001
Insulina (μU/ml)	7.6 (2.3-15)	16 (11-27) <sup>a</sup>	12 (3.5-26) <sup>a, b</sup>	-----	<0.0001
HOMA-IR	1.7 (0.4-2.69)	3.8 (2.7- 6.5) <sup>a</sup>	4.2 (1.1-20.2) <sup>a</sup>	-----	<0.0001
HOMA-B (%)	9.2 (3.2-31)	16 (9.7-35) <sup>a</sup>	9 (2.4-46.2) <sup>a, b</sup>	-----	<0.0001
TAG (mg/dL)	160 (52-350)	189 (52-417)	176 (52-512)	190 (26-494)	0.0172
CT (mg/dL)	188 (83-305)	200 (134-375)	199 (81-336)	183 (63-324)	0.0402
C-HDL (mg/dL)	50 (18-109)	50 (32-93)	49 (29-88)	46 (9-95)	0.3759
C-LDL (mg/dL)	111 (53-203)	116 (63-227)	115 (34-224)	106 (40-167)	0.7583
Creatinina (mg/dL)	0.79 (0.39-1.2)	0.8 (0.5-1.2)	0.8 (0.37-1.3)	0.77 (0.15-2.5)	0.7042

Los datos se presentan como la media (mínimo-máximo). IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, HBA1c: hemoglobina glucosilada, HOMA-IR: modelo de evaluación de resistencia a la insulina, HOMA-B: funcionalidad de la célula β, TAG: triacilgliceroles CT: colesterol total, C-HDL: colesterol de alta densidad, C-LDL: colesterol de baja densidad. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup> p < 0.05 vs NG, <sup>b</sup> p < 0.05 vs NG RI, <sup>c</sup> p < 0.05 vs GAA.

Se puede observar que la edad fue mayor en los pacientes con DM2. La media de IMC se encuentra en intervalos de sobrepeso en los pacientes con NG y DM2 (27 y

29 kg/m<sup>2</sup>) y en obesidad (30 y 31 kg/m<sup>2</sup>) en pacientes con NG RI y GAA. La presión arterial sistólica y diastólica se altera en los pacientes con DM2, con un incremento de la media entre 5 y 2%,  $p < 0.0001$ .

Es evidente que desde el estado NG RI y GAA RI hay pérdida de sensibilidad a la insulina y funcionalidad de la célula  $\beta$ . Las variables de HOMA-IR y HOMA-B no se determinaron en los pacientes con DM2, debido a que se conoce que la respuesta tisular a la acción de la insulina esta disminuida por la misma enfermedad.

Asimismo, el grupo de pacientes con DM2 clasificado con y sin tratamiento fue reclasificado nuevamente de acuerdo a la HbA1c (con y sin control glucémico).

### **7.1.2 Características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM2.**

En la Tabla 7, se presentan las características clínicas y antropométricas de los pacientes DM2 con (DM2 T) y sin (DM2 NT) tratamiento farmacológico.

El IMC de los DM2 T se encontró una media de sobrepeso (29 kg/m<sup>2</sup>) en comparación con el grupo de los DM2 NT que pesentaron una media en obesidad (30 kg/m<sup>2</sup>). Solo las concentraciones de C-HDL fueron menores en un 29% en el grupo DM2 NT en comparación con los DM2 T.

**Tabla 7.** Características clínicas y antropométricas de los pacientes diabéticos con (DM2 T) y sin (DM2 NT) tratamiento farmacológico hipoglucemiante.

<b>Variables</b>	<b>NG (n=177)</b>	<b>DM2 T (n= 119)</b>	<b>DM2 NT (n= 40)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	48 (35-79)	58 (36-80) <sup>a</sup>	55 (35-82) <sup>a</sup>	<0.0001
Masculino, n (%)	87 (49)	58 (49)	16 (40)	-----
Femenino, n (%)	90 (51)	61 (51)	24 (60)	-----
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 (18-43)	29 (19-42) <sup>a</sup>	30 (19-45) <sup>a</sup>	0.0002
PAS (mmHg)	113 (80-160)	120 (90-160) <sup>a</sup>	118 (100-150)	<0.0001
PAD (mmHg)	75 (60-100)	77 (50-100) <sup>a</sup>	78 (54-100) <sup>a</sup>	0.0249
Glucosa (mg/dL)	89 (63-99)	152 (62-487) <sup>a</sup>	171 (74-298) <sup>a</sup>	<0.0001
HbA1c (%)	4.7 (3-6.6)	7.4 (4-14) <sup>a</sup>	6.4 (4.1-10.6) <sup>a</sup>	<0.0001
TAG (mg/dL)	165 (52-418)	175 (47-467)	228 (50-497) <sup>a</sup>	0.0354
CT (mg/dL)	188 (83-305)	184 (84-324)	182 (63-255)	0.0927
C-HDL (mg/dL)	50 (18-109)	54 (28-95)	38 (9-61) <sup>a, b</sup>	0.9832
C-LDL (mg/dL)	111 (53-203)	101 (40-167)	111 (81-131)	0.5099
Creatinina (mg/dL)	0.79 (0.39-1.5)	0.78 (0.4-1.3)	0.76 (0.15-1.3)	0.7126
Tiempo de evolución (años)	-----	9.7 (0-30)	6.3 (0-16)	0.0364

Los datos se presentan como la media (mínimo-máximo). IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, HBA1c: hemoglobina glucosilada, TAG: triacilgliceroles, CT: colesterol total, C-HDL: colesterol de alta densidad, C-LDL: colesterol de baja densidad. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 T.

Para la clasificación de control glucémico, tanto en los DM2 T con y sin tratamiento farmacológico hipoglucémico se presentan las características clínicas y antropométricas en la Tablas 8 y 9. Se encontró que tanto las concentraciones de glucosa como las de HbA1c, fueron mayores en el grupo DM2 con tratamiento farmacológico y sin control glucémico (DM2 T NCT) en un 36% y 34%, respectivamente en comparación con el grupo de pacientes DM2 CON con tratamiento farmacológico y control glucémico (DM2 T NCT) (Tabla 8).

En cuanto a la clasificación de los DM2 NT con y sin control glucémico (Tabla 9), solo se presentó mayores valores en ambos grupos (DM2NT CT y DM2 NT NCT) en las variables de edad, IMC, glucosa, HbA1c y TAG en comparación con el grupo NG.



**Tabla 8.** Características clínicas y antropométricas de los pacientes diabéticos con tratamiento farmacológico hipoglucemiante con (DM2 T CT) y sin (DM2 T NCT) control glucémico.

<b>Variabes</b>	<b>NG (n= 177)</b>	<b>DM2 T CT (n= 49)</b>	<b>DM2 T NCT (n= 56)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	48 (35-79)	58 (36-80) <sup>a</sup>	57 (39-73) <sup>a</sup>	<0.0001
Masculino, n (%)	89 (49)	21 (42)	33 (59)	-----
Femenino, n (%)	91 (51)	28 (57)	23 (41)	-----
IMC (kg/m2)	27 (19-42)	29 (19-42) <sup>a</sup>	29 (19-38) <sup>a</sup>	0.0007
PAS (mmHg)	113 (80-160)	120 (90-140) <sup>a</sup>	119 (90-160) <sup>a</sup>	0.0003
PAD (mmHg)	75 (60-100)	77 (60-100)	75 (50-100)	0.1706
Glucosa (mg/dL)	89 (63-99)	116 (70-229) <sup>a</sup>	180 (62-487) <sup>a, b</sup>	<0.0001
HbA1c (%)	4.7 (3-6.6)	5.8 (4-6.9) <sup>a</sup>	8.8 (7-14) <sup>a, b</sup>	<0.0001
TAG (mg/dL)	165 (52-418)	172 (47-467)	219 (94-436)	0.7488
CT (mg/dL)	188 (83-305)	180 (84-316)	187 (95-324)	0.2513
C-HDL (mg/dL)	50 (18-109)	53 (28-84)	50 (18-109)	0.5329
C-LDL (mg/dL)	111 (53-203)	94 (40-167)	111 (53-203)	0.4336
Creatinina (mg/dL)	0.78 (0.39-1.2)	0.77 (0.4-1.12)	0.79 (0.5-1.3)	0.8395
Tiempo de evolución (años)	-----	8.6 (0-30)	9.8 (0-26)	0.1371

Los datos se presentan como la media (mínimo-máximo). IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, HBA1c: hemoglobina glucosilada, TAG: triacilgliceroles, CT: colesterol total, C-HDL: colesterol de alta densidad, C-LDL: colesterol de baja densidad. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 T CT.

**Tabla 9.** Características clínicas y antropométricas de los pacientes diabéticos sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante con (DM2 NT CT) y sin (DM2 NT NCT) control glucémico.

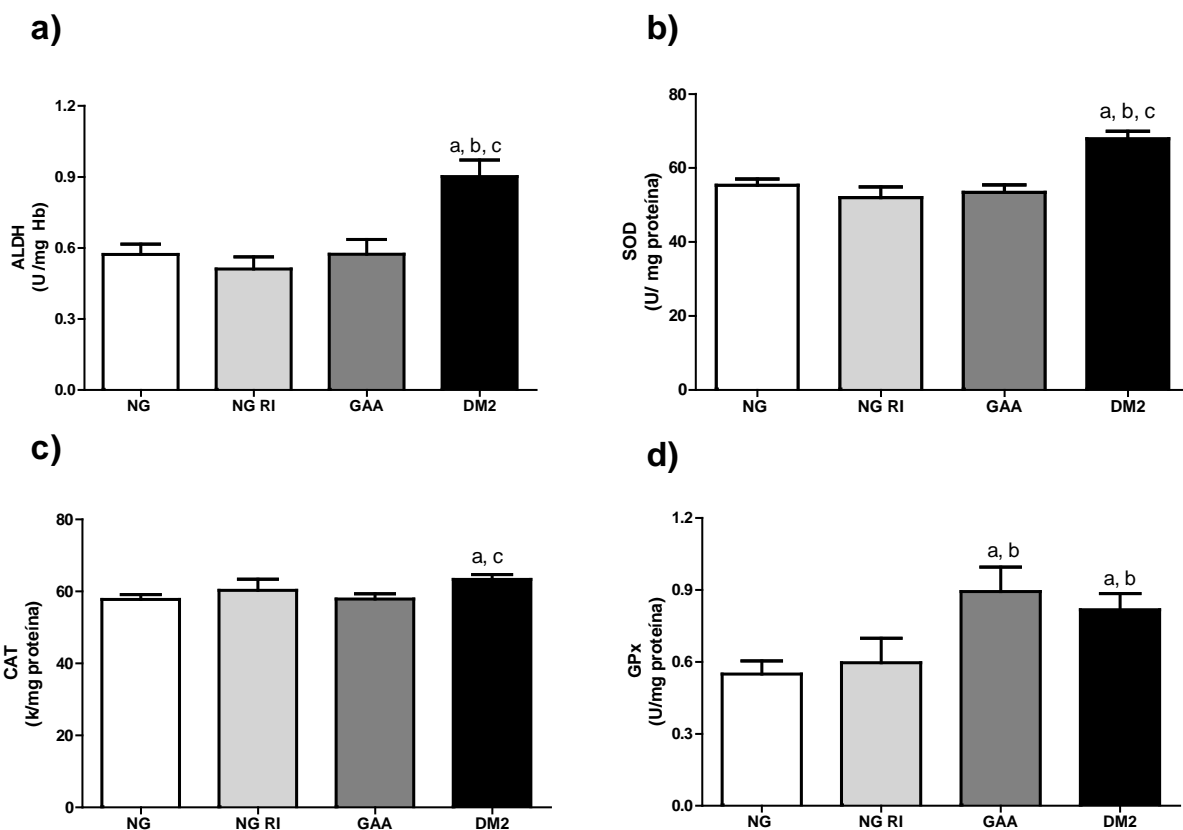
<b>Variables</b>	<b>NG (n= 177)</b>	<b>DM2 NT CT (n= 25)</b>	<b>DM2 NT NCT (n= 10)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	48 (35-79)	56 (42-82) <sup>a</sup>	57 (36-72) <sup>a</sup>	<0.0001
Masculino, n (%)	89 (49)	9 (36)	3 (30)	-----
Femenino, n (%)	91 (51)	16 (64)	7 (70)	-----
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 (18-43)	30 (19-45) <sup>a</sup>	29 (23-39) <sup>a</sup>	0.0145
PAS (mmHg)	113 (80-160)	119 (100-150)	117 (100-130)	<0.1171
PAD (mmHg)	75 (60-100)	78 (60-100) <sup>a</sup>	77 (54-100)	0.2010
Glucosa (mg/dL)	89 (63-99)	147 (75-298) <sup>a</sup>	180 (142-254) <sup>a</sup>	<0.0001
HbA1c (%)	4.7 (3-6.6)	5.7 (4.1-6.9) <sup>a</sup>	8.2 (7-10.6) <sup>a</sup>	<0.0001
TAG (mg/dL)	165 (52-418)	241 (50-494) <sup>a</sup>	209 (94-436) <sup>a</sup>	0.0107
CT (mg/dL)	188 (83-305)	183 (63-255)	184 (121-247)	0.9777
C-HDL (mg/dL)	50 (18-109)	39 (16-61)	38 (26-51)	0.0724
C-LDL (mg/dL)	111 (53-203)	103 (81-119)	127 (124-131)	0.1361
Creatinina (mg/dL)	0.78 (0.39-1.2)	0.82 (0.15-1.3)	0.6 (0.35-0.95)	0.0770
Tiempo de evolución (años)	-----	7.5 (0-16)	3.2 (0-14)	0.2211

Los datos se presentan como la media (mínimo-máximo). IMC: índice de masa corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, HBA1c: hemoglobina glucosilada, TAG: triacilgliceroles, CT: colesterol total, C-HDL: colesterol de alta densidad, C-LDL: colesterol de baja densidad. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 NT CT.

## 7.2 Actividad de la ALDH y de las enzimas antioxidantes.

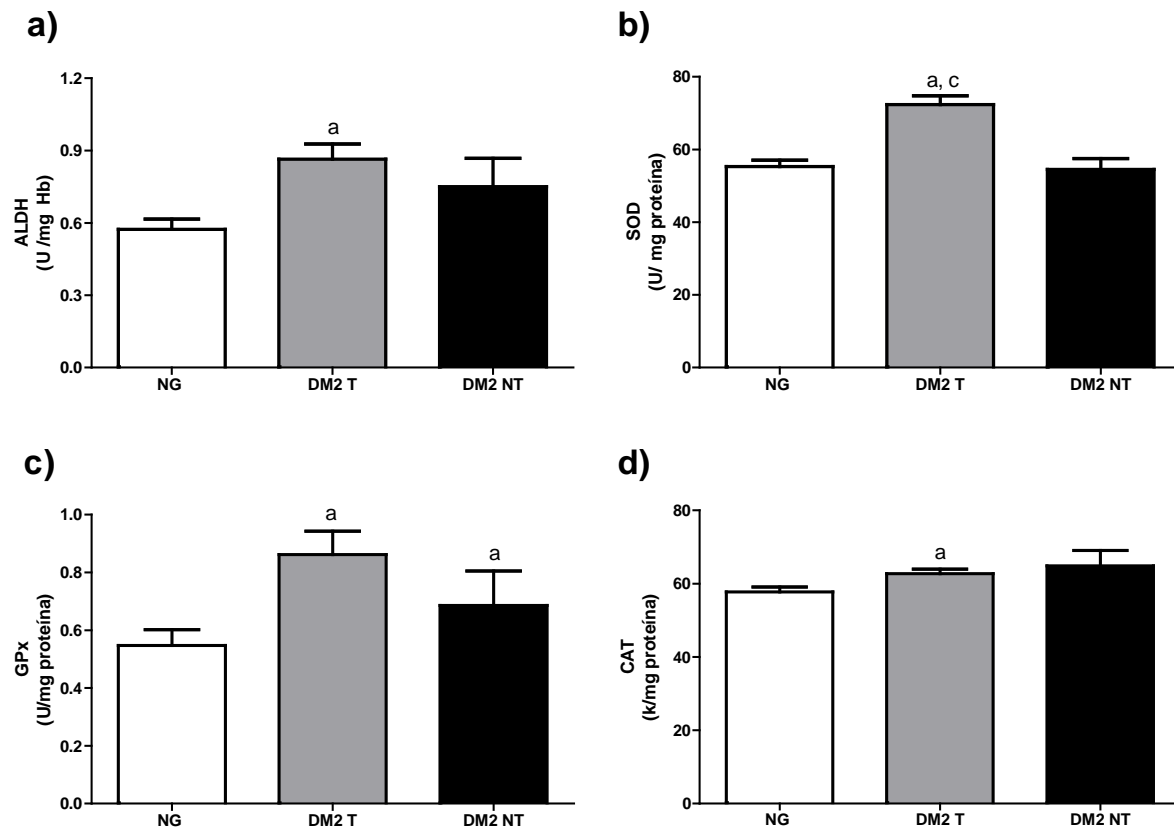
La actividad de las enzimas antioxidantes fue determinada en los eritrocitos (Figura 12). Mayor actividad de las enzimas ALDH (36%, 44%, 37%,  $p<0.0001$ ) y SOD (18%, 23%, 21%  $p<0.0001$ ), se presentaron en los DM2 en comparación con los grupos NG, NG RI, GAA. La actividad de CAT solo fue mayor en el grupo de los pacientes con DM2 en comparación con los grupos NG y GAA (8% y 9%,  $p= 0.0003$ , respectivamente).

En cuanto a la actividad de la GPx (Figura 12, d), se observa mayor actividad en el grupo de GAA en comparación con los grupos NG y NG RI (38% y 33%,  $p<0.0001$ ). Asimismo, la actividad en los DM2 fue mayor en un 34% y 29%,  $p<0.0001$  en comparación con los grupos NG y NG RI.



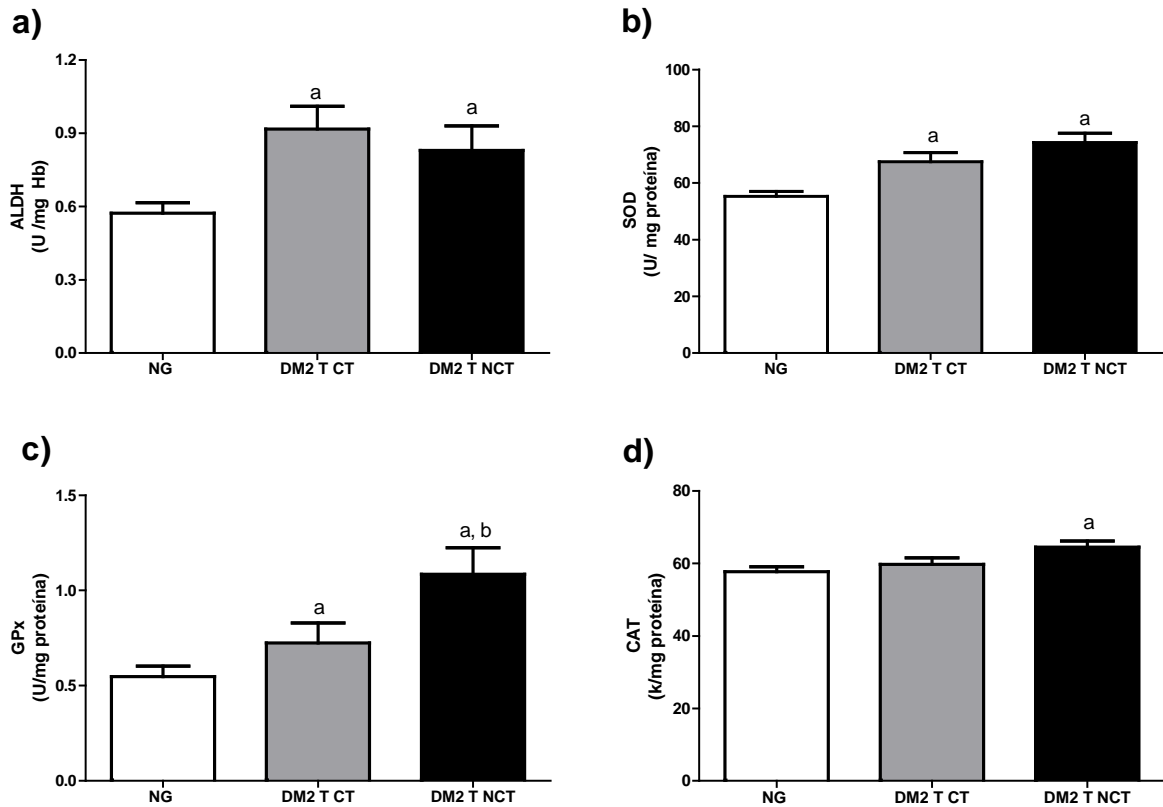
**Figura 12.** Actividad de enzimas antioxidantes (ALDH, SOD, CAT, GPx). a) ALDH: aldehído deshidrogenasa, b) SOD: superóxido dismutasa, c) CAT: catalasa, d) GPx: glutatión peroxidasa. NG: Normoglucémicos, NG RI: Normoglucémicos con RI, GAA: Glucosa alterada en ayunas, DM2: Diabetes mellitus tipo 2. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs NG RI, <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs GAA.

En la clasificación de los DM2 de acuerdo al tratamiento farmacológico hipoglucemiante (Figura 13), se presenta mayor actividad de las enzimas ALDH (34%,  $p < 0.0001$ ), SOD (23%,  $p < 0.0001$ ), CAT (11%,  $p = 0.0007$ ) y GPx (38%,  $p < 0.0001$ ) en el grupo DM2 T en comparación con los NG. La actividad de SOD es la única que presenta diferencia de un 25%,  $p < 0.0001$  entre el grupo DM2T y DM2 NT. La GPx presentó un aumento de actividad de 36%,  $p < 0.0001$  en la GAA en comparación con la NG.



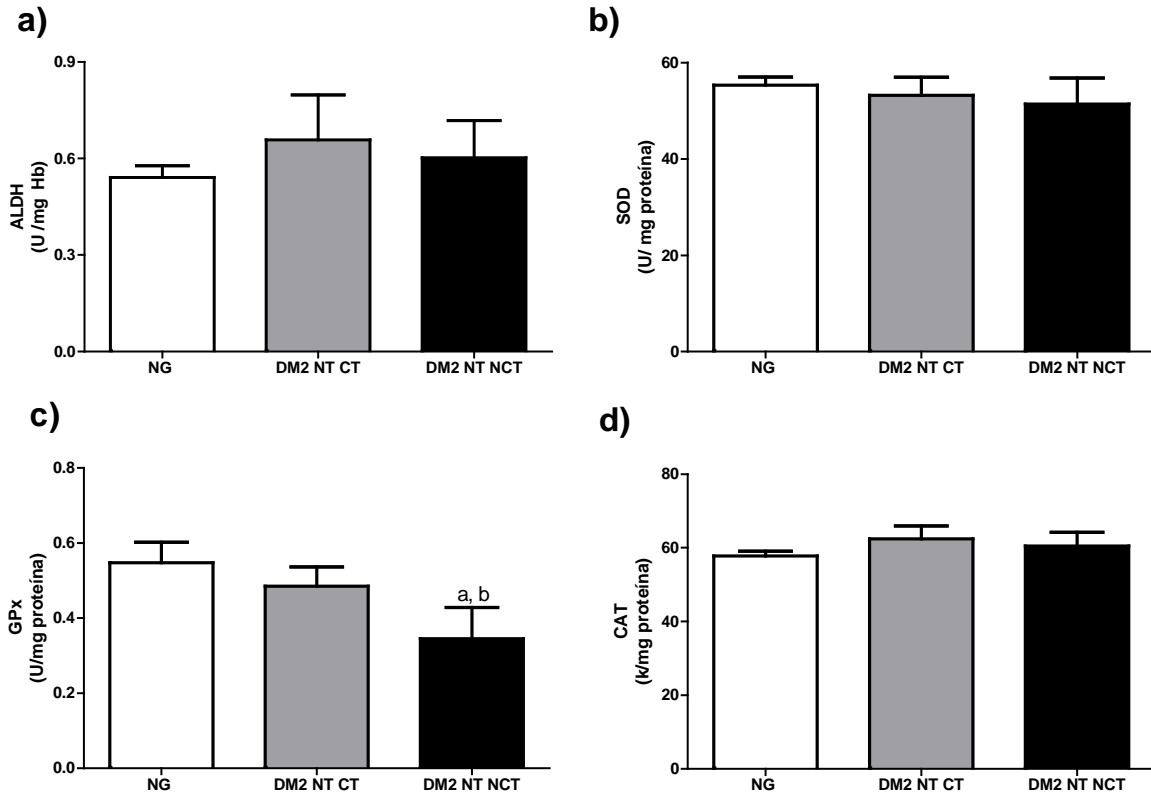
**Figura 13.** Actividad de enzimas antioxidantes (ALDH, SOD, CAT, GPx) clasificados por tratamiento farmacológico hipoglucemiante. a) ALDH: aldehído deshidrogenasa, b) SOD: superóxido dismutasa, c) CAT: catalasa, d) GPx: glutatión peroxidasa. NG: Normoglicémicos, NG RI: Normoglicémicos con RI, DM2 T: DM2 con tratamiento hipoglucemiante, DM2 NT: DM2 sin tratamiento hipoglucemiante. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 T.

Asimismo, los grupos de DM2 T (Figura 14) y DM2 NT (Figura 15) se clasificaron de acuerdo a la HbA1c. Mayor actividad de ALDH (31%,  $p<0.0001$ ), SOD (25%,  $p<0.0001$ ), GPx (49%,  $p<0.0001$ ) y CAT (10%,  $p<0.0001$ ) se presentaron en los pacientes con DM2 T NT CT en comparación con los NG. De igual manera se presento mayor actividad enzimática de ALDH (37%,  $p<0.0001$ ), SOD (18,  $p<0.0001$ ), GPx (24%,  $p<0.0001$ ) en los DM2 T CT en comparación con los NG. Solo la actividad de la GPx (Figura 15, d debe decir 14, c) fue mayor en el grupo DM2 T NT en un 33%,  $p<0.0001$  en comparación con el DM2 T NCT.



**Figura 14.** Actividad de enzimas antioxidantes (ALDH, SOD, CAT, GPx) con tratamiento farmacológico hipoglucemiante clasificadas por control glucémico. a) ALDH: aldehído deshidrogenasa, b) SOD: superóxido dismutasa, c) CAT: catalasa, d) GPx: glutatión peroxidasa. NG: Normoglicémicos, NG RI: Normoglicémicos con RI, DM2 T: DM2 con tratamiento hipoglucemiante, DM2 NT: DM2 sin tratamiento hipoglucemiante. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 T CT.

Los resultados referentes a la clasificación de acuerdo a la HbA1c (Figura 15C) de los DM2 NT NCT, solo la actividad de la GPx fue menor en comparación con los NG (37%,  $p < 0.0001$ ) y los DM2 NT CT (30%,  $p < 0.0001$ ).

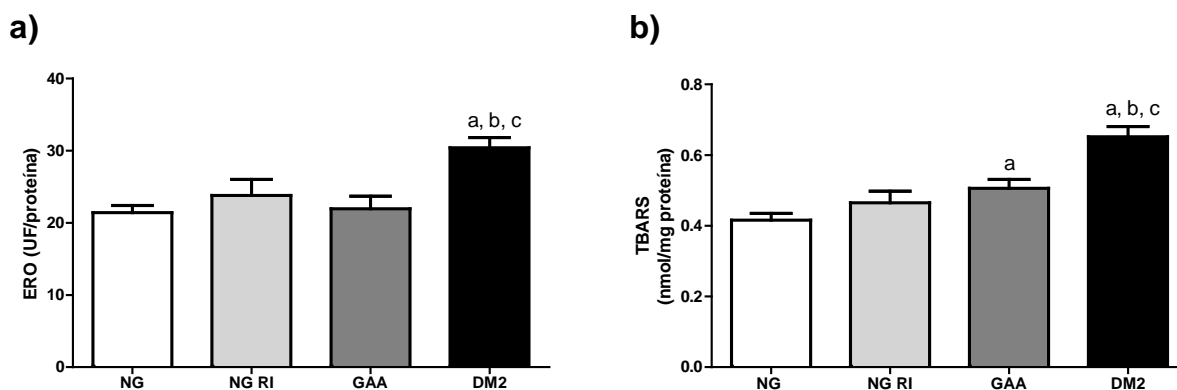


**Figura 15.** Actividad de enzimas antioxidantes (ALDH, SOD, CAT, GPx) sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante clasificadas por control glucémico. a) ALDH: aldehído deshidrogenasa, b) SOD: superóxido dismutasa, c) CAT: catalasa, d) GPx: glutatión peroxidasa. NG: Normoglucémicos, DM2 NT CT: DM2 sin tratamiento con control glucémico, DM2 NT NCT: DM2 con tratamiento sin control glucémico. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 NT CT.



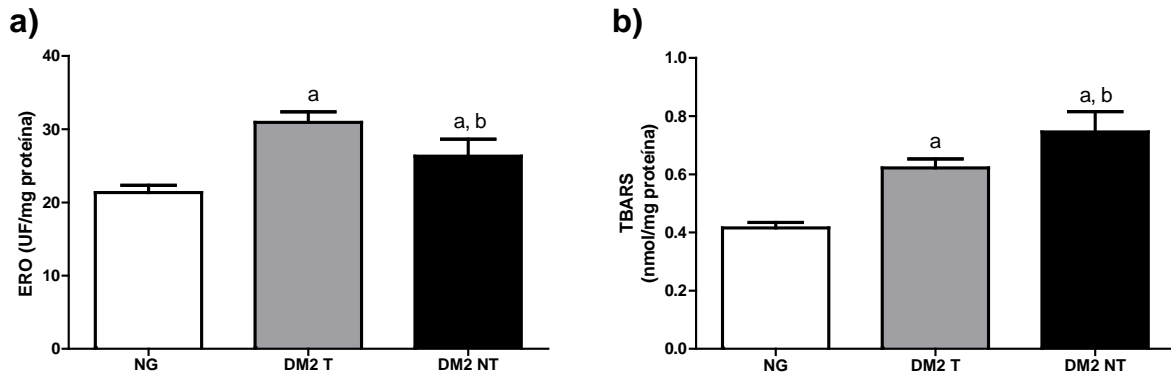
### 7.3 Marcadores de estrés oxidante.

Las concentraciones de ERO (22%, 23%, 22%,  $p < 0.0001$ ) como de TBARS (35%, 20%, 21%,  $p < 0.0001$ ), fueron mayores en los pacientes con DM2 en comparación con los grupos NG, NG RI y GAA respectivamente, presentados en la Figura 16. Además, los niveles de TBARS fueron mayores en un 17%,  $p < 0.0001$  en el grupo de GAA en comparación con el grupo NG (Figura 16, b).



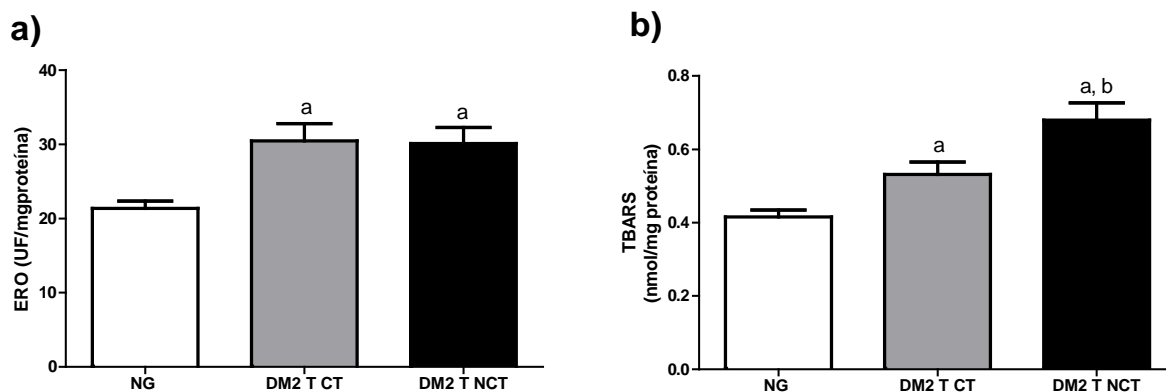
**Figura 16.** Concentraciones de marcadores de EO. a) ERO: especies reactivas de oxígeno, b) TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. NG: Normoglucémicos, NG RI: Normoglucémicos con RI, GAA: Glucosa alterada en ayunas, DM2: Diabetes mellitus tipo 2. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs NG RI, <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs GAA.

De igual manera, cuando se clasificaron los DM2 de acuerdo al tratamiento farmacológico hipoglucemiante (Figura 17), se presentaron mayores concentraciones de las ERO en los grupos DM2 T (33%,  $p < 0.0001$ ) y DM2 NT (44 %,  $p < 0.0001$ ) en comparación con el grupo NG. Las concentraciones de TBARS fueron mayores en los grupo DM2 T (31%,  $p < 0.0001$ ) y DM2 NCT (18%,  $p < 0.0001$ ) en comparación con el grupo NG. Además, las concentraciones tanto de ERO como de TBARS fueron diferentes entre los DM2 T y DM2 NT. En los pacientes DM2 T las concentraciones ERO fueron mayores en un (14%,  $p < 0.0001$ ) y las de TBARS menores en un (17%,  $p < 0.0001$ ) en comparación con los pacientes DM2 NT.



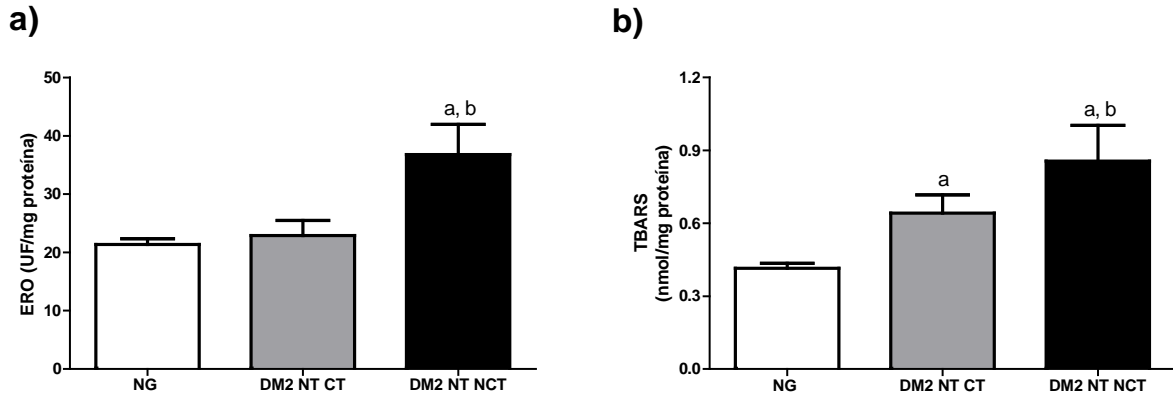
**Figura 17.** Concentraciones de marcadores de EO en DM2 clasificados con tratamiento farmacológico hipoglucemiante. a) ERO: especies reactivas de oxígeno, b) TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. NG: Normoglucémicos, NG RI: Normoglucémicos con RI, DM2 T: DM2 con tratamiento hipoglucemiante, DM2 NT: DM2 sin tratamiento hipoglucemiante. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 T.

Finalmente, en cuanto a la clasificaron los DM2 T (Figura 18) y DM2 NT (Figura 19) de acuerdo a la HbA1c, se observa que tanto los pacientes con DM2 T CT y como los del grupo de DM2 T NCT tienen mayores concentraciones tanto de ERO (29%, 29%,  $p < 0.0001$ , respectivamente) y TBARS (28%, 63%,  $p < 0.0001$  respectivamente) en comparación con los pacietes del grupo NG. Los pacientes del grupo DM2 T NCT presentaron mayores concentraciones de TBARS (22%,  $p < 0.0001$ ) en compracion con el grupo DM2 T CT.



**Figura 18.** Concentraciones de marcadores de EO en DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante y clasificados por control glucémico. a) ERO: especies reactivas de oxígeno, b) TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. NG: Normoglicémicos, NG RI: Normoglicémicos con RI, DM2 T: DM2 con tratamiento hipoglucemiante, DM2 NT: DM2 sin tratamiento hipoglucemiante. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 T CT.

El grupo de DM2 NT NCT (Figura 19) presentaron mayores concentraciones de ERO y TBARS en comparación con el grupo NG (41% y 51%  $p < 0.0001$ , respectivamente) y con el grupo DM2 NT CT (37%, 51%,  $p < 0.0001$ , respectivamente). Solo las concentraciones de TBARS también fueron mayores en un 25%,  $p < 0.0001$  en el grupo DM2 NT CT en comparación con el grupo NG.



**Figura 19.** Concentraciones de marcadores de EO en DM2 sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante y clasificados por control glucémico. a) ERO: especies reactivas de oxígeno, b) TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. NG: Normoglucémicos, DM2 NT CT: DM2 sin tratamiento y con control glucémico, DM2 NT NCT: DM2 con tratamiento y sin control glucémico. Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs NG, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs DM2 NT CT.

## **7.5 Asociación de las actividades enzimáticas y concentraciones de marcadores en la DM2.**

El análisis de regresión logística se aplicaron con el fin de explicar la asociación de las actividades de la ALDH, enzimas antioxidantes y concentraciones de los marcadores de EO con la RI, GAA y DM2 con y sin tratamiento farmacológico hipoglucemiante, estos resultados se presentan en la Tabla 11. La regresión logística multivariada se realizó después de ajustar por edad, género, glucosa e insulina.

Se puede observar que las variables asociadas ( $OR>1$ ) a la NG RI y GAA fueron el IMC, la glucosa, HbA1c y los TBARS.

En la DM2 se encontró que las variables asociadas fueron la HbA1c, ALDH, SOD y TBARS y en la DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante se encontró asociación con las variables ALDH, HbA1c y SOD.

**Tabla 11.** % Asociaciones significativas de actividades antioxidantes y marcadores de estrés oxidante en RI, GAA y DM2.

<b>NG vs NG RI</b>		
<b>Variable</b>	<b>OR crudo, IC, p, R<sup>2</sup></b>	<b>OR ajustado, IC, p</b>
Glucosa	1.2, 1.09-1.24, <0.0001, 0.1099	1.3, 1.1-1.2, <0.0001
TBARS	2.9, 1.08-7.8, 0.033, 0.0175	3.8, 1.1-13.02, 0.033
<b>0 NG, 1 NG RI</b>		<b>R<sup>2</sup>= 0.2624</b>
<b>NG vs GAA</b>		
<b>Variable</b>	<b>OR crudo, IC, p, R<sup>2</sup></b>	<b>OR ajustado, IC, p</b>
IMC	1.2, 1.14-1.29, <0.0001, 0.1126	1.23, 1.15-1.32, <0.0001
HbA1c	2.02, 1.43-2.84, <0.0001, 0.0399	2.13, 1.44-3.16, <0.0001
TBARS	3.8, 1.6-8.9, <0.0001, 0.0227	5.58, 2.07-15.06, 0.001
<b>0 NG, 1 GAA</b>		<b>R<sup>2</sup>= 0.1976</b>
<b>NG vs DM2</b>		
<b>Variable</b>	<b>OR crudo, IC, p, R<sup>2</sup></b>	<b>OR ajustado, IC, p</b>
HbA1c	4.41. 2.64-7.37, <0.0001, 0.3147	3.3, 1.98- 5.52, <0.0001
ALDH	1.88, 1.21- 2.91, 0.004, 0.0408	2.26, 1.2 -4.2, 0.011
TBARS	6.12, 5.05-15.59, <0.0001, 0.1332	5.08, 2.25-11.08, 0.004
<b>0 NG, 1 DM2</b>		<b>R<sup>2</sup>= 0.3706</b>
<b>NG RI vs GAA</b>		
<b>Variable</b>	<b>OR crudo, IC, p, R<sup>2</sup></b>	<b>OR ajustado, IC, p</b>
GPx	1.4, 0.97-2.08, 0.070, 0.0171	1.5, 1.02-2.19, 0.038
<b>0 NG RI, 1 GAA</b>		<b>R<sup>2</sup>= 0.0494</b>
<b>GAA vs DM2</b>		
<b>Variable</b>	<b>OR crudo, IC, p, R<sup>2</sup></b>	<b>OR ajustado, IC, p</b>
ALDH	1.77, 1.11-2.83, 0.015, 0.0388	3.5, 1.65 -7.46, 0.001
TBARS	8.44, 2.45-19.07, 0.001, 0.0790	6.23, 1.06 - 16.47, 0.042
<b>0 GAA, 1 DM2</b>		<b>R<sup>2</sup>= 0.4140</b>
<b>DM2 T vs DM2 NT</b>		
<b>Variable</b>	<b>OR crudo, IC, p, R<sup>2</sup></b>	<b>OR ajustado, IC, p</b>
HbA1c	0.75, 0.58-0.96, 0.027, 0.0362	0.76, 0.59-0.99, 0.048
SOD	0.96, 0.94-0.98, 0.004, 0.029	0.97, 0.95-0.99, 0.011
ALDH	2.70, 1.17 - 5.25, 0.028	2.72, 1.27 - 5.83, 0.010
<b>0 DM2 T, 1 DM2 NT</b>		<b>R<sup>2</sup> =0.1719</b>

Regresión logística ( $p < 0.05$ ). Los resultados se presentan como OR: Odds Riesgo (% Asociación de cada variable), IC: intervalo de confianza,  $p$ : Significancia estadística y  $R^2$ : coeficiente de determinación ( $p$  y  $R^2$  de cada variable y de cada modelo).

## VIII. DISCUSIÓN

Cada día el número de pacientes diagnosticados con diabetes en México y alrededor del mundo se incrementa, siendo necesario un régimen de dieta, control de la enfermedad y tratamiento farmacológico hipoglucemiante efectivo para prevenir o aminorar las complicaciones de la enfermedad.

La DM2 está caracterizada por hiperglucemia y LPO [115]. El EO juega un papel en la patogénesis de la diabetes y en sus complicaciones secundarias [127, 152, 130, 153, 154, 116 ], es considerado como una de las mayores consecuencias de la DM2 que afectan a las enzimas antioxidantes en eritrocitos [116]. Sin embargo, la información acerca del EO en individuos con alguno de los estados de RI o aquellos que se incluyen en la prediabetes (como en el caso de la GAA) además, de la DM2 bajo tratamiento farmacológico hipoglucemiante y/o con control glucémico es escasa [117-122]. Pero se conoce, que las enzimas antioxidantes tienen un papel protector contra el EO [123, 124]. Asimismo, durante la DM2 se incrementa la LPO y por lo tanto hay participación de la ALDH para aminorar los daños [125].

Giebułtowicz y col, 2014 [102], determinó que la actividad de ALDH en sangre es significativamente mayor en pacientes con DM2 con una relación positiva entre la actividad de la ALDH y las concentraciones de HbA1c. En el presente estudio, la actividad de la ALDH y otras enzimas involucradas en la defensa antioxidante como también algunos marcadores de EO en eritrocitos de sujetos NG, con estados previos a la DM2 con presencia de RI y en DM2 (con y sin tratamiento hipoglucémico; y con y sin control glucémico) fueron evaluados.

Los pacientes con GAA y DM2 presentaron concentraciones de glucosa de 108 y 153 mg/dL, respectivamente y de HbA1c (5 y 7.3%, respectivamente). Los índices HOMA indicaron evidencia de aumento de RI (HOMA-IR) y disminución de la reserva de insulina (HOMA-B) en los grupos NG RI y GAA. Asimismo, se presentó mayor IMC en los sujetos que presentaron RI.

En los pacientes con DM2, se encontró mayor actividad de las enzimas ALDH, SOD, CAT y GPx y concentraciones de los marcadores ERO y TBARS en eritrocitos



de pacientes con DM2 en comparación con sujetos no diabéticos. Tanto el aumento de la actividad de la ALDH, enzimas antioxidantes y concentraciones de marcadores de EO en los pacientes con DM2, se debe a un aumento del EO y LPO por procesos de glucooxidación debido a la hiperglucemia [102, 127]. El aumento de la actividad de la enzima ALDH, SOD, CAT y GPx en la DM2 no es simplemente un resultado de la cuenta eritrocitaria [127], sino del daño a los eritrocitos por el aumento de LPO y EO, siendo este hallazgo consistente con los reportado por otros grupos [127, 131, 133].

La ALDH, es la enzima responsable de la reducción de la vida media de acetaldehídos en pacientes diabéticos [102, 128]. Con el fin de prevenir el daño en eritrocitos provocado por el aumento de la LPO involucrado durante la DM2 [116, 124, 125, 129, 130]. Se sugiere que la actividad de ALDH aumentó a una tasa más alta para contrarrestar la concentración de los de TBARS [131]. Se ha descrito ampliamente que la hiperglucemia crónica provoca EO en la DM2. Existe mayor de producción de  $O_2^*$  y  $H_2O_2$  en eritrocitos [132, 133]. El aumento en la actividad de SOD en la DM2 fue consistente con otros estudios [127, 131]. La SOD se considera la enzima principal en la eliminación directa de radicales superóxido [134, 140], teniendo mayor actividad en los eritrocitos contra el daño causado por oxidasas evitando la oxidación del oxígeno [117, 127].

En los eritrocitos existe alta producción de  $H_2O_2$  debido a la autooxidación de la hemoglobina. Las principales enzimas encargadas de metabolizar el  $H_2O_2$  son la CAT y GPx.

Los eritrocitos son células blanco debido a que sufren mayor producción de  $H_2O_2$  por la autooxidación de la hemoglobina. Para la eliminación del  $H_2O_2$  en los eritrocitos, están las enzimas CAT y GPx [116, 133, 38, 135]. En nuestro estudio se presentaron mayores actividades tanto de la CAT y de la GPx en la DM2 concordando con diferentes antecedentes [116, 135]. En cuanto a la actividad de la GPx, esta fue mayor desde el estado de GAA hasta la DM2, lo cual está relacionado con la detoxificación de ERO como el  $H_2O_2$  previamente antes de la DM2.

En el presente estudio los pacientes diabéticos presentaron mayor EO debido a que tuvieron mayores concentraciones de ERO y TBARS. Las ERO y los TBARS se consideran marcadores de EO, siendo los TBARS productos finales de la LPO asociados con la hiperglucemia [118, 136].

Igualmente, se ha reportado que los sujetos no diabéticos con RI, presentan mayores concentraciones de TBARS durante estados de desarrollo de la DM2 debido al desbalance producido por la hiperglucemia concordando con nuestros resultados [102, 116, 117, 127, 130, 153, 155, 156].

Dos importantes consecuencias de la hiperglucemia en la DM2 son el EO y la LPO. El aumento de TBARS y por tanto de la ALDH, puede deberse que durante la DM2 hay incremento de la formación de los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) que liberan RL y por lo tanto inducen EO [137].

En el grupo de DM2 sin tratamiento farmacológico presento alta variabilidad estadística, sugiriendo que estos pacientes tienen diferente curso de la enfermedad. Es posible que estos pacientes con un tiempo de evolución menor de la enfermedad muestren menor actividad de las enzimas antioxidantes (ALDH y CAT) con el grupo de DM2 con tratamiento. Sin embargo, en los análisis de regresión logística se observo que solo la actividad de ALDH y la SOD tuvieron asociación significativa con el tratamiento farmacológico hipoglucémico en la DM2.

Cuando los pacientes con DM2 con y sin tratamiento farmacológico se clasificaron bajo control glucémico, se observo que el comportamiento de las enzimas antioxidantes y marcadores de EO fue similar al de los sujetos con DM2 tratados con control glucémico. La presencia de altas actividades enzimáticas en el grupo de DM2 con tratamiento hipoglucemiante puede evitar un daño significativo debido al incremento de ERO y TBARS.

Es posible que este nuevo balance de enzimas antioxidantes es un mecanismo en contra del EO que previene las complicaciones clásicas de la misma [152]. En contraste, el perfil enzimático fue similar al de los sujetos NG con excepción de la GPx

y las concentraciones de TBARS y ERO fueron mayores en este grupo de pacientes con DM2 sin tratamiento farmacológico con control glucémico [138, 139]. La medición de HbA1c resulta una herramienta importante debido a que provee una medida de los valores crónicos de la glucosa por lo tanto, se sugiere que la presencia de menor glucemia o mayor control glucémico, mayores actividades enzimáticas y concentraciones de marcadores de EO pueden encontrarse en estos sujetos sugiriendo que el daño oxidante puede ser menor para tener un control metabólico. Estos resultados concuerdan con estudios donde han reportado asociación entre los productos de LPO y control glucémico y aumento de los marcadores de LPO y glucosa en plasma en DM2 sin control glucémico [125, 126].

El aumento de las concentraciones de TBARS en diabéticos sin control glucémico se debe a una disfunción del metabolismo de los lípidos (LPO) [141], o a un cambio funcional en la membrana del eritrocito continuando por una inhibición de algunas enzimas antioxidantes que resulta en acumulación de ER [142]. Además, pacientes diabéticos con un pobre control glucémico, tienen mayor acumulación de polioles y mayor oxidación mediada por ERO. Igualmente debido a la toxicidad de la glucosa hay mayor acumulación de productos de glucosilación es decir, mayores concentraciones de HbA1c [142, 143].

Diferentes estudios clínicos con continuo monitoreo del tratamiento farmacológico, han encontrado mejor defensa antioxidante en la DM2 con el tratamiento de metformina como monoterapia o en combinación. Estos resultados concuerdan con los de Pavlovic y col, 2000 [144], donde evaluaron en pacientes diabéticos el efecto de la monoterapia con metformina sobre la actividad de SOD, CAT y GPx en plasma y eritrocitos concluyendo un aumento en la respuesta antioxidante.

Ghadge y col. 2015 [121] determinó un aumento de la actividad de SOD y la disminución la actividad de CAT en suero de pacientes con DM2 tratados con metformina sola o en combinación con otros fármacos hipoglucemiantes.

Otros fármacos hipoglucemiantes como las sulfonilureas tanto en monoterapia como en combinación o la insulina en combinación con biguanidinas [130] están

asociados a un buen control glucémico y aumento de defensa antioxidante. El control glucémico se asocia con el grado de hiperglucemia y el EO, un pobre control glucémico induce EO y este a su vez induce un aumento de la defensa antioxidante [118, 125].

Se puede deducir que nuestra muestra analizada de pacientes con DM2 con tratamiento hipoglucemiante tuvo un deficiente apego al tratamiento o que este fue inadecuado en muchos de nuestros pacientes reclutados debido a que el 56% no tuvo control glucémico. Esta situación pone en riesgo a los pacientes debido a mayor probabilidad de complicaciones, lo que genera un mayor costo económico al paciente y al sistema de salud. Del 72.5 % de los pacientes en México que están bajo un tratamiento hipoglucémico oral solo el 25% de los pacientes refleja un buen control metabólico bajo tratamiento [157].

Se ha establecido que el tratamiento hipoglucemiante mejora la defensa antioxidante en pacientes con DM2 [144, 145]. Estos resultados indican que el tratamiento farmacológico afecta de manera significativa tanto la actividad de las enzimas y marcadores asociados al EO y que además, el tratamiento farmacológico reduce la generación de ERO [146], siendo posible que aumente la expresión de las enzimas antioxidantes en DM2 T para mitigar el daño por EO y LPO. 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 antiinflamatoria [147], reduce la expresión de la NADPH oxidasa e incrementa la expresión de enzimas antioxidantes en monocitos y macrófagos humanos [146] además, de mejorar la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, en el hígado y dar protección contra complicaciones vasculares, especialmente para los pacientes con obesidad y resistencia a la insulina [33, 119-121, 145].

La HbA1c y los TBARS están asociados desde el estado GAA. Existen pocos estudios de EO en GAA y de acuerdo a nuestros resultados, observamos que el EO es más evidente en la DM2 que durante GAA. Bandeira y cols, 2012 [117], demostraron la disminución de la actividad de SOD y altas concentraciones de TBARS en estado prediabético (GAA), lo que concuerda con lo encontrado en este estudio.

De manera interesante la actividad de GPx fue mayor significativamente en la RI y GAA. Una mayor actividad de GPx puede explicarse por los altos niveles de GSH el (cofactor de esta enzima) que se ven alterados durante el EO [120, 149].

Asimismo, la concentración de las ERO aumentaron en la DM2. Los estudios clínicos y experimentales revelan que los niveles de ERO se incrementan durante el inicio y desarrollo de la diabetes [28, 45]. Las ERO que se generan en la diabetes afectan a varios tejidos entre ellos los glóbulos rojos. Además, se sugiere que en la diabetes no sólo se estimula la generación de ERO, sino que también hay capacidad de una célula o tejido de proteger contra el EO incrementado la actividad antioxidante como una posible respuesta de adaptación [148]. Las células que sufren de EO, han desarrollado su propio sistema de defensa antioxidante inducible, que incluyen componentes enzimáticos y no enzimáticos [150].

El encontrar una asociación de ALDH y las otras enzimas antioxidantes en los eritrocitos durante los estados de RI, GAA y DM2, sugiere que tienen un papel importante como atrapadores de moléculas que se producen bajo el EO y que pueden ser un factor pronóstico potencial en la etapa previa y desarrollo de la DM2.

También, hay que tener en cuenta que diferentes niveles de defensa antioxidante se atribuyen a factores genéticos que pudieran alterar la funcionalidad y actividad de estas enzimas de acuerdo a las poblaciones. Otro factor son las diferencias físicas y fisiológicas entre hombres y mujeres, tales como la distribución del tejido adiposo y la masa muscular. Se ha encontrado que las mujeres sufren menos EO debido a la protección estrogénica, lo que puede mejorar la capacidad antioxidante [151] observando que en nuestro estudio hubo mayor participación de mujeres.

Así, en este estudio se apoyan varios hallazgos establecidos y se contribuyó a determinar la asociación de la actividad de la ALDH en la DM2 con tratamiento hipoglucémico. Además, de presentar por primera vez la actividad de ALDH en población mexicana. Se propone que los pacientes deben tener un estricto control/apoyo de tratamiento farmacológico lo que conlleva a un buen manejo de control glucémico para reducir el EO, lo que daría una mejor perspectiva para evitar complicaciones. Nuestro sistema de salud debe mejorar la vigilancia de los pacientes

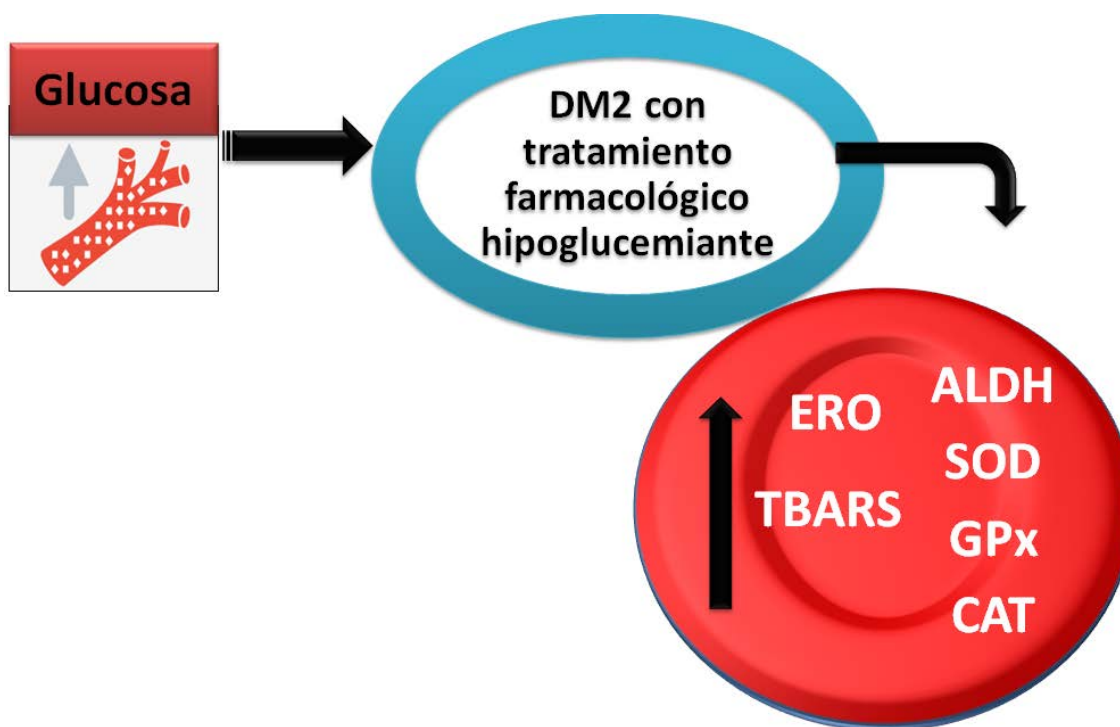
diabéticos para determinar el mejor tratamiento para cada paciente. Por lo tanto, una terapia ideal para la diabetes sería un tratamiento farmacológico que no sólo posee un efecto hipoglucémico, sino que también mejore o protega el sistema de defensa antioxidante que esta involucrado [18, 145, 152, 154].

Son necesarios más estudios preclínicos, clínicos y genéticos para explicar los cambios observados en las actividades de las enzimas antioxidantes y los marcadores EO durante el inicio, la permanencia y las complicaciones de la diabetes.

## IX. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

Se ha mencionado que la LPO y el EO son condiciones importantes que se presentan durante los estados prediabéticos y DM2 propiciado un aumento de la defensa antioxidante.

Por lo tanto, en este estudio los pacientes con DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante presentaron mayor actividad enzimática antioxidante de la ALDH, SOD, GPx y CAT confirmándose con asociación indirecta de las enzimas ALDH y SOD en DM2 con tratamiento hipoglucemiante (Figura 20).



**Figura 20.** Integración de los resultados en los pacientes con DM2. La hiperglucemia promueven el desarrollo de EO y LPO, el cual puede ser detectado en eritrocitos por un incremento de ERO y TBARS. Estos estados de EO son contrarrestados por el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes ALDH, SOD, CAT y GPx durante la DM2 con tratamiento hipoglucemiante.

## **X. CONCLUSIÓN**

En este estudio se determinaron mayores actividades de ALDH y SOD asociadas al tratamiento farmacológico hipoglucemiante. La DM2 con tratamiento farmacológico hipoglucemiante y control glucémico presento un mayores actividades antioxidantes (ALDH, SOD, GPx y CAT) lo cual puede ayudar a prevenir el desarrollo de complicaciones.



## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Atlas de la diabetes de la FID. [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas). 2015; 7a Edición.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27: 1047-53.
3. Pública INdS. Encuesta nacional de Salud y Nutrición. Daños y servicios a la Salud Cuernavaca, M.I.S., Disponible en [http://consulta.mx/web/index.php/estudios-e-investigaciones/otros estudios /502-encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-2012-ensanut](http://consulta.mx/web/index.php/estudios-e-investigaciones/otros_estudios/502-encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-2012-ensanut).
4. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1999; 104: 787-94.
5. Leibowitz G1, Bachar E, Shaked M, Sinai A, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N. Glucose regulation of beta-cell stress in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 12: 66-75.
6. Kaneto H, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Sakamoto K, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9: 355-66.
7. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, 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. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 2008; 29: 351-66.
9. Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev*. 2014; 94: 1-34.

10. Marchitti, S.A., et al. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008; 4: 697-720.
11. O'Brien, P.J., A.G. Siraki, and N. Shangari, Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol.* 2005; 35: 609-62.
12. Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev.* 2012; 6: 520-39.
13. World Health Organization. Definition. Diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO Consultation. Part1: Diagnosis and clasification of diabetes mellitus. Geneve: World Heath Organization; 1999.
14. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. *Med Clin North Am.* 2015; 99: 1-16.
15. Arredondo, A., E. De Icaza. The cost of diabetes in Latin America: evidence from Mexico. *Value Health.* 2011; 14: 85-8.
16. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. *Med Clin North Am.* 2015; 99:1-16.
17. Abdulfatai B. Olokoba,, Olusegun A. Obateru, Lateefat B. Olokoba. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J.* 2012; 27: 269–273.
18. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2014; 34: S11-61.
19. Silvio E. Inzucchi S, E. Diagnosis of Diabetes. *N Engl J Med.* 2012; 367: 542-550.

20. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 1327-1334.
21. National Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and another categories of glucose tolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-67.
22. 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. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26:3160-7.
23. Velázquez O, González A. Recomendaciones para la promoción de la salud, prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, y control de la prediabetes. *Diabetes Hoy*. 2006; VII: 1708-1745.
24. Boutati EI, Raptis SA. Self- Monitoring of Blood Glucose as Part of the Integral care of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2009, 32: S205- S210.
25. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005; 26: 19-39.
26. Monroy GA. Evaluación de la sensibilidad a la insulina. *Sistemas de medición. Aplicaciones a la práctica clínica 4ª Edición*. 2012; 33-39.
27. Zhuo FU, Elizabeth R. Gilbert, Dongmin Liu. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2013; 25–53.
28. Olivares Reyes JA, Arellano Plancarte A. Bases moleculares de las enzimas. *REB*. 2008; 27: 9-18.
29. Vinay K; Ramzi S, Cotran RS y Stanley L. Robbins SL. *Patología humana (7ma edición)*. Elsevier, España 2005; 1195.

30. Robertson RP. Beta-cell deterioration during diabetes: what's in the gun? *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20: 388-93.
31. Muniyappa, R., et al., Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 2008; 294: E15-26.
32. Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R., Zinman, B. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* 2009; 132: 193-203.
33. De Fronzo. Banting Lecture. From the trimvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009; 58: 773- 795.
34. Maedler K: Beta cells in type 2 diabetes – a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes Obes Metab.* 2008; 10: 408-420.
35. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 463-4678.
36. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 ; 287: 199-206.
37. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 2000; 289: 2122-2125.
38. Abdul-Ghani MA. Type 2 diabetes and the evolving paradigm in glucose regulation. *Am J Manag Care.* 2013; 19: S43-50.

39. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, Stengård J, Kesäniemi YA. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*. 1992; 35: 1060-1067.
40. Cook JT, Hattersley AT, Levy JC, Patel P, Wainscoat JS, Hockaday TD, Turner RC. Distribution of Type II diabetes in nuclear families. *Diabetes*. 1993; 42:106-12.
41. Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Rev*. 1990; 6:1-27.
42. Richens ER, Abdella N, Jayyab AK., Alsaffar M, Behbehani K. Type 2 Diabetes in Arab patients in Kuwait. *Diabetic Med*. 1988; 5: 231-234.
43. Kashyap SR, DeFronzo RA. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *DiabVasc Dis Res*. 2007; 4: 13-19.
44. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006; 20: 665-79.
45. Le Roith D., Quon MJ, Zick Y. molecular and cellular aspects of insulin resistance: Implications for diabetes. En: *Signal Transduction and Human Disease*. Editor: Finkel T, Gutkind JS. Hoboken, New Jersey Wiley-Interscience. 2003; 171-200.
46. Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci*. 2007; 405-13.
47. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 13: 799-806.
48. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. 2010; 53: 1270–1287.

49. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assesment: insulin resistance and beta-cell funtion from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28: 412-419.
50. Monroy GA. Evaluación de la sensibilidad a la insulina. *Sistemas de medición. Aplicaciones a la práctica clínica 4ª Edición*. 2012; 33-39.
51. Clark P, Hales CN. How to measure plasma insulin. *Diabetes Metab Rev*. 1994; 10: 79-90.
52. Antuna-Puente, B., et al., How can we measure insulin sensitivity/resistance? *Diabetes Metab*. 2011; 37: 179-88.
53. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006; 440: 944-48.
54. Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabe Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers*. 2013, 378790.
55. Loh K, Deng H, Fukushima A, et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2009; 10: 260-72.
56. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J*. 2016; 24:547-553.
57. Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *J Biomark*. 2013; 378790: 1155.
58. Calderón-Salinas JV, Muñoz Reyes EG , Quintanar Escorza MA. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB*. 2013; 32: 53-66.
59. Moussa, S.A. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian J. Biophys*. 2008; 18: 225–236.

60. Kohen R, Abraham N. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic pathology*. 2002; 30: 620-650.
61. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 1990; 9: 1-32.
62. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*. 1995; 49: 1341-1348.
63. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000; 355: 1179-1180.
64. O'Brien, P.J., A.G. Siraki, and N. Shangari, Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol*. 2005; 35: 609-62.
65. Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev*. 2012; 6: 520-39.
66. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011; 435: 297-312.
67. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*. 2003; 278: 36027-31.
68. Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. 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*. 2005; 7: 619-26.
69. Liochev, S., Fridovich, I. The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO in vitro and in vivo. *Free Rad Bio Med*. 1994; 16: 29-33.

70. Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Marselli L, Boggi U. The beta-cell in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 654: 501-14.
71. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD. 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: 573-81.
72. Nakayama M, Inoguchi T, Sonta T, Maeda Y, Sasaki S, Sawada F, Tsubouchi H, Sonoda N, Kobayashi K, Sumimoto H, Nawata H. 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.* 2005; 15; 332: 927-33.
73. Uchizono Y, Takeya R, Iwase M, Sasaki N, Oku M, Imoto H, Iida M, Sumimoto H. Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci.* 2006; 14; 80:133-9.
74. Xiang FL, Lu X, Strutt B, Hill DJ, Feng Q. NOX2 deficiency protects against streptozotocin-induced beta-cell destruction and development of diabetes in mice. *Diabetes.* 2010; 59: 2603-11.
75. Chang TJ, Weaver JR, Bowman A, Leone K, Raab R, Vinik AI, Pittenger GL, Taylor-Fishwick DA. Targeted expression of islet neogenesis associated protein to beta cells enhances glucose tolerance and confers resistance to streptozotocin-induced hyperglycemia. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 335: 104-9.
76. Aebi HE. Catalasa in vitro. *Meth Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
77. Yu, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74: 139-162.
78. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840: 2709-29.



79. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 15; 212: 167-78.
80. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes.* 1989; 38: 1539-43.
81. Hermann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 402-9.
82. Wallace, J.I. Management of diabetes in elderly. *Clin. Diabetes.* 2004.
83. Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 5535-41.
84. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 993-9.
85. Schaffer SW, Jong CJ, Mozaffari M. Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: unifying hypothesis of diabetes revisited. *Vascul Pharmacol.* 2012; 57: 139-49.
86. Pacher P, Szabó C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol.* 2006; 6: 136-41.
87. Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat MA, Thorpe JE, Testa R, Boemi M, Giugliano D. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2008; 57: 1349-54.

88. Johnson EL. Glycemic variability in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress and macrovascular complications. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 771:139-54.
89. Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev.* 2012; 64: 520-39.
90. Wang HJ, Kang PF, Wu WJ, Tang Y, Pan QQ, Ye HW, Tang B, Li ZH, Gao Q. Changes in cardiac mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity in relation to oxidative stress and inflammatory injury in diabetic rats. *Mol Med Rep.* 2013; 8: 686-90.
91. Leslie RD, Pyke DA. Chlorpropamide-alcohol flushing: a dominantly inherited trait associated with diabetes. *Br Med J.* 1978; 2: 1519-1521.
92. Pyke DA, Leslie RD. Chlorpropamide-alcohol flushing: a definition of its relation to non-insulin-dependent diabetes. *Br Med J.* 1978; 2: 1521-1522.
93. Jung JG, Kim JS, Oh MK. The role of the flushing response in the relationship between alcohol consumption and insulin resistance. *Alcoholism Clin Exp Res.* 2010; 34: 1699-1704.
94. Murata C, Suzuki Y, Muramatsu T, Taniyama M, Atsumi Y, Matsuoka K, Watanabe T, Okazaki I. Inactive aldehyde dehydrogenase 2 worsens glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus who drink low to moderate amounts of alcohol. *Alcoholism Clin Exp Res.* 2000; 24: 5S-11S.
95. Murata C, Taniyama M, Kuriyama S, Muramatsu T, Atsumi Y, Matsuoka K, Suzuki Y. Meta-analysis of three diabetes population studies: association of inactive ALDH2 genotype with maternal inheritance of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004; 66: S145-147.

96. Suzuki Y, Muramatsu T, Taniyama M, Atsumi Y, Kawaguchi R, Higuchi S, Hosokawa K, Asahina T, Murata C, Matsuoka K. Association of aldehyde dehydrogenase with inheritance of NIDDM. *Diabetologia*. 1996; 39: 1115-1118.
97. Wang J, Wang H, Hao P, Xue L, Wei S, Zhang Y, Chen Y. Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Mol Med*. 2011; 17: 172-179.
98. Zhang Y, Babcock SA, Hu N, Maris JR, Wang H, Ren J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy: role of GSK3beta and mitochondrial function. *BMC Med*. 2012; 10: 40.
99. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med*. 2005; 39: 841–852.
100. Hwang ES, Kim GH. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology*. 2007; 229: 1–10.
101. Serra JA, Dominguez RO, Marschoff ER, Guareschi EM, Famulari AL, Boveris A. Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging. *Neurochem Res*. 2009; 34: 2122–2132.
102. Giebułtowicz J, Sołobodowska S, Bobilewicz D, Wroczyński P. Blood ALDH1 and GST activity in diabetes type 2 and its correlation with glycated hemoglobin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014; 122: 55-59.
103. Xu F, Sun Y, Shang R, Li M, Cui L, Cui Z, Chen Y. The Glu504Lys Polymorphism of Aldehyde Dehydrogenase 2 Contributes to Development of Coronary Artery Disease. *Tohoku J. Exp. Med*. 2014; 234: 143-50.
104. Morita K1, Saruwatari J, Miyagawa H, Uchiyashiki Y, Oniki K, Sakata M, Kajiwara A, Yoshida A, Jinnouchi H, Nakagawa K.. Association between aldehyde dehydrogenase 2 polymorphisms and the incidence of diabetic

retinopathy among Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetol.* 2013; 12: 132.

105. Dakeishi M, Murata K, Sasaki M, Tamura A, Iwata T. Association of alcohol dehydrogenase 2 and aldehyde dehydrogenase 2 genotypes with fasting plasma glucose levels in Japanese male and female workers. *Alcohol Alcohol.* 2008; 43: 143-7.

106. Simó R, Hernández C. Tratamiento de la diabetes mellitus: objetivos generales y manejo en la práctica clínica. *Puesta al día, IV.* 2002: 847-854.

107. Rosas M, Rosas GJ. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2. Pan American Health Organization Web: [www1.pano.org/dm\\_documents/2010/Guías\\_ALAD\\_2009](http://www1.pano.org/dm_documents/2010/Guías_ALAD_2009).

108. Rawles JW, Rhodes DL, Potter JJ, Mezey E. Characterization of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase. *Biochem Pharmacol*; 1987. 36: 3715 -22.

109. Oberley, L.W, Spitz D.R, Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol*, 1984; 105: 457-64.

110. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 1984; 105: 121-126.

111. Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MD, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Ibarra-Rubio ME. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol Cell Biochem*, 2001; 216: 9-19.

112. Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z, Ali SF, Santamaría A. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L- carnitine. *J Neurochem*, 2008; 105: 677-689.

113. Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. HO-1 induction attenuates renal damage

and oxidative stress induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. *Free Radic Biol Med*, 2003; 34:1390-8.

114. Tabachnick BG, Fidell LS. *Using multivariate statistics* 6th ed. Pearson, 2012.

115. Pari L, Latha M. Effect of *Cassia auriculata* flowers on blood sugar levels, serum and tissue lipids in streptozotocin diabetic rats. *Singapore Med J*. 2002; 43: 617-21.

116. Waggiallah H, Alzohairy M. The effect of oxidative stress on human red cells glutathione peroxidase, glutathione reductase level, and prevalence of anemia among diabetics. *N. Am. J. Med. Sci*. 2011; 3: 344.

117. Bandeira S de M, Guedes Gda S, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, Rabelo LA, Vasconcelos SM, Goulart MO. Characterization of Blood Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: Increase in Lipid Peroxidation and SOD Activity. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2012; 1-13.

118. Goodarzi MT, Varmaziar L, Navidi AA, Parivar K. Study of oxidative stress in type 2 diabetic patients and its relationship with glycated hemoglobin. *Saudi Med J*. 2008; 29: 503-6.

119. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract*. 2011; 93: 56-62.

120. Pavlović D, Kocić R, Kocić G, Jevtović T, Radenković S, Mikić D, Stojanović M, Djordjević PB. 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: 251-6.

121. Ghadge A, Harke S, Khadke S, Diwan A, Pankaj M, Kulkarni O, Ranjekar P, Harsulkar A, Kuvalekar AA. Effects of commonly used antidiabetic drugs on

antioxidant enzymes and liver function test markers in type 2 diabetes mellitus subjects - pilot study. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2015; 123: 500-7.

122. Stitt, A.W., A.J. Jenkins, and M.E. Cooper, Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002; 11: 1205-23.

123. Robertson, L.A., Kim A.J., Werstuck G.H. Mechanisms linking diabetes mellitus to the development of atherosclerosis: a role for endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006; 84: 39-48.

124. Talaei, A., M. Mohamadi, Adgi Z. The effect of vitamin D on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2013; 5: 8.

125. Bhutia Y, Ghosh A, Sherpa ML, Pal R, Mohanta PK. Serum malondialdehyde level: Surrogate stress marker in the Sikkimese diabetics. *J Nat Sci Biol Med.* 2014; 2: 107-12.

126. Soliman, G.Z., Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Med J.* 2008; 49: 129-36.

127. 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.* 2015; 39: 44-9.

128. Ohlin H, Jerntorp P, Brattström L, Almér LO, Israelsson B. Altered metabolism of acetaldehyde in blood is not a specific marker of diabetic macroangiopathy. *Diabetes Res.* 1991; 16: 75-9.

129. Xu F, Sun Y, Shang R, Li M, Cui L, Cui Z, Chen Y. The Glu504Lys Polymorphism of Aldehyde Dehydrogenase 2 Contributes to Development of Coronary Artery Disease. *Tohoku J. Exp. Med.* 2014; 234: 143-50.

130. Huri HZ, Ling DY, Ahmad WA. Association between glycemic control and antidiabetic drugs in type 2 diabetes mellitus patients with cardiovascular complications. *Drug. Des. Devel. Ther.* 2015; 18: 4735-49.
131. Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta.* 2002, 321: 89-96.
132. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 575-86.
133. Johnson RM, Goyette G, Ravindranath Y, Ho Y-S, Red cells from glutathione peroxidase-1-deficient mice have nearly normal defenses against exogenous peroxides. *Blood.* 2000; 96:1985-1988.
134. Maussa, S.A. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian Journal of Biophysics.* 2008; 18: 225-236.
135. Góth L. Catalase Deficiency and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2008; 31: e93-e93.
136. Kumawat, M. Lipid peroxidation and lipid profile in type 2 diabetes mellitus. *Webmed Central Biochem,* 2013. 3: WMC003147.
137. Nakhjavani M, Esteghamati A, Nowroozi S, Asgarani F, Rashidi A, Khalilzadeh O. Type 2 diabetes mellitus duration: an independent predictor of serum malondialdehyde levels. *Singapore Med J.* 2010; 51: 582-5.
138. Noberasco G, Odetti P, Boeri D, Maiello M, Adezati L. Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed Pharmacother.* 1991; 45:193-6.
139. Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 647-53.

140. Jiménez-Osorio AS, Picazo A, González-Reyes S, Barrera-Oviedo D, Rodríguez-Arellano ME, Pedraza-Chaverri J. Nrf2 and redox status in prediabetic and diabetic patients. *Int J Mol Sci.* 2014; 6: 20290-305.
141. Suckling KE, Jackson B. Animal models of human lipid metabolism. *Prog Lipid Res.* 1993; 32:1-24.
142. Freitas JP, Filipe PM, Rodrigo FG. Lipid peroxidation in type 2 normolipidemic diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 1997; 36:71-5.
143. Whiting PH, Kalansooriya A, Holbrook I, Haddad F, Jennings PE. The relationship between chronic glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci.* 2008; 65:71-4.
144. 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.
145. Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, Noshad S, Mousavizadeh M, Hedayati M, Nakhjavani M. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Clin. Nutr.* 2013; 32: 179-85.
146. Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Machnik G, Bołdys A, Basiak M, Bogusław O. Metformin reduces the expression of NADPH oxidase and increases the expression of antioxidative enzymes in human monocytes/macrophages cultured in vitro. *Exp Ther Med.* 2016; 11: 1095-1103.
147. Skrha J, Prázný M, Hilgertová J, Kvasnicka J, Kalousová M, Zima T. Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007; 63:1107-14.



148. Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, Bayraktar N. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 2002; 39: 117-122.
149. 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.
150. Singh, M, Shin S. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief review. *Indian J Exp Biol.* 2009; 47: 7-15.
151. Brunelli E, Domanico F, La Russa D, Pellegrino D. Sex differences in oxidative stress biomarkers. *Curr Drug Targets.* 2014; 15: 811-5.
152. Araki, E., Nishikawa, T. Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *J Diabetes Investig.* 2010; 1: 90- 96.
153. Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N., Mohamed, J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2012;12, 5-18.
154. Shen, G.X. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2012; 12, 106-112.
155. Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B.C., Matsumoto, A., Thompson, D.C., Vasiliou, V. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med.* 2013; 56: 89-101.
156. Kopprasch, S., Srirangan, D., Bergmann, S., Graessler, J., Schwarz, P.E., Bornstein, S.R. Association between systemic oxidative stress and insulin resistance/sensitivity indices – the PREDIAS study. *Clinical Endocrinol (Oxf).* 2006; 84, 48-54.

157. Gutiérrez, J.P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Hernández-Ávila, M., 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).
158. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265–275.
159. Owen R, Fennema O.R, Annenbaum S.R.T. *Introducción a la Química de Alimentos.*

## XII. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado

HOSPITAL REGIONAL LIC. ADOLFO LÓPEZ MATEOS (HRLALM)  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN  
Laboratorio de Medicina Genómica

### 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, Dr. Julio Alberto Cruz Santana, Medicina Interna, HRLALM.

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 cénicos 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.

Dr. Julio Alberto Cruz Santana, Medicina Interna, HRLALM.

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			

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						
Abuelos maternos						

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

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			
Acanthis 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: Sí ___ No ___					
Edad de diagnóstico:	Glucosa promedio:	Tx:	Hospitalización: si ___ no ___		
Complicaciones	Nefropatía: si ___ no ___	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	





Molecular and cellular pharmacology

## Hypoglycemic drugs induce antioxidant aldehyde dehydrogenase activity and remain high in patients with glycemic control in type 2 diabetes



Alejandra Picazo<sup>a</sup>, Angélica S. Jiménez-Osorio<sup>b</sup>, Porfirio Zúñiga-Mejía<sup>c</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>b</sup>, Adriana Monroy<sup>d</sup>, M. Eunice Rodríguez-Arellano<sup>e</sup>, Diana Barrera-Oviedo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, National Autonomous University of Mexico (UNAM), University City 04510, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Faculty of Chemistry, Department of Biology, National Autonomous University of Mexico (UNAM), University City, 04510 Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Medical Center Dalínde, Tuxpan 25, Roma Sur, 06760 Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> General Hospital of Mexico, Dr. Balmis 148, Doctores, 06726 Mexico City, Mexico

<sup>e</sup> Research Department, Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos", ISSSTE, Av. Universidad 1321, Florida, 01030 Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Aldehyde dehydrogenase

Superoxide dismutase

Thiobarbituric acid reactive substances

### ABSTRACT

The antioxidant system results essential to control and prevent lipid peroxidation due to stress damage in type 2 diabetes. An example is aldehyde dehydrogenase (ALDH), an enzyme that is involved in the detoxification of aldehydes formed during lipid peroxidation. This study was conducted to evaluate ALDH activity and to determine their association with hypoglycemic treatment in type 2 diabetes patients.

The study population consisted of 422 Mexican subjects: a control group and type 2 diabetes patients. Type 2 diabetes patients were re-classified as those with or without hypoglycemic treatment and those with or without glycemic control (according to glycated hemoglobin (HbA1c)). Clinical parameters, antioxidant enzyme activities (ALDH, superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase) and oxidative markers (reactive oxygen species and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)) were evaluated.

The activity of antioxidant enzymes and oxidative stress markers were higher in type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment and without glycemic control than control group. The activity of ALDH and SOD remained high in type 2 diabetes patients with moderate glycemic control while only ALDH's remained high in type 2 diabetes patients with tight glycemic control. Increased ALDH and SOD activities were associated with hypoglycemic therapy. TBARS levels were associated with glycemic control.

The persistence of high ALDH and SOD activities in type 2 diabetes patients with glycemic control may be to avoid a significant damage due to the increase in reactive oxygen species and TBARS. It is possible that this new oxidative status prevented the development the classical complications of diabetes.

### 1. Introduction

Oxidative stress is thought to play a key role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus by impairing insulin secretion or increasing insulin resistance (Araki and Nishikawa, 2010; Robertson, 2009, 2002). Lipid peroxidation generates toxic aldehydes such as malondialdehyde, acetaldehyde, and 4-hydroxy-2-nonenal that can form adducts with proteins, leading to cell damage and organ dysfunction. Thus, aldehydes may contribute to the deleterious consequences of oxidative stress in diabetes (Turk et al., 2002). Lipid peroxidation is decreased through several enzymatic systems like aldehyde dehydrogenases that are able to oxidize aldehydes to their respective organic acid. ALDH is a crucial enzyme responsible for the metabolism or

detoxification of acetaldehyde and other toxic aldehydes (Chen et al., 2014).

The American Diabetes Association (ADA) recommends lifestyle modifications and metformin for initial pharmacological therapy of type 2 diabetes (2014). Studies have shown improvement in the disease complications and antioxidant defense with metformin alone or in combination with other drugs (Chakraborty et al., 2011; Esteghamati et al., 2013, 2000). However, due to the progressive nature of the disease, most patients will require the use of a combination pharmacological therapy to reach therapeutic goals. The ADA recommends adding a sulfonylurea or insulin when metformin monotherapy is insufficient to reach or maintain target goals (ADA, 2014, Nathan et al., 2009; Phung et al., 2010). Some hypoglycemic drugs currently

\* Correspondence to: Torre de Investigación Sexto Piso, Lab. 5, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), C.P. 04510, México DF, Mexico.

E-mail address: [dianabarrera@hotmail.com](mailto:dianabarrera@hotmail.com) (D. Barrera-Oviedo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.027>

Received 14 December 2016; Received in revised form 15 February 2017; Accepted 15 February 2017

Available online 16 February 2017

0014-2999/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

employed (insulin, sulfonylureas or biguanidines) improve antioxidant defense and prevent diabetes complications (ADA, 2014, Araki and Nishikawa, 2010, Esteghamati et al., 2013; Shen, 2012).

In this observational study, the effects of hypoglycemic drugs on ALDH (EC 1.2.1.3) activity were explored in type 2 diabetes patients. Moreover, the levels of the widely studied oxidative stress status markers (reactive oxygen species and TBARS) as well as the antioxidant enzymes (SOD (EC 1.15.1.1), CAT (EC 1.11.1.6) and GPx (EC 1.11.1.9)) that metabolize the principal reactive oxygen species were determined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. 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 Research Department, Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos", ISSSTE (registration number 209.2013), General Hospital of Mexico (registration number DI/11/UME/4/46) and Faculty of Medicine, UNAM (Project number 059–2012). All participants agreed to participate in the study by signed a consent form prior to the application of the research protocol.

Inclusion criteria were according to ADA standards (ADA, 2014; Nathan et al., 2009): 1) Control subjects (CT): Without any type of diabetes, fast plasmatic glucose  $\leq 99$  mg/dl; 2) Patients with type 2 diabetes (D NT): Diagnosis of type 2 diabetes, fast plasmatic glucose  $\geq 126$  mg/dl and without treatment; 3) Patients with type 2 diabetes and treatment (D T): Diagnosis of type 2 diabetes and hypoglycemic drugs treatment (insulin, metformin and glibenclamide alone or in combination); 4) Patients with type 2 diabetes treated with hypoglycemic drugs and with glycemic control (D T C): according to HbA1c levels ( $< 6.5\%$ ); and 5) Patients with type 2 diabetes treated with hypoglycemic drugs and without glycemic control (D T NC): according to HbA1c levels ( $\geq 6.5\%$ ). D T C and D T NC groups were subdivided into two groups for analysis.

Exclusion criteria of subjects were as follows: with type 1 diabetes, gestational diabetes, pregnant or lactating women, no Mexican origins, younger than 35 years old, alcoholics or with excessive alcohol consumption, with bleeding disorders, erythrocythemia or anemia, with diabetic nephropathy, with mental health problems or unable to sign the informed consent to participate in the study. Only subjects with complete data were included for the statistical analysis.

### 2.2. Sample collection and clinical analysis

Two samples (6 ml each) of venous peripheral blood were obtained from antecubital vein after 8–10 h of nighttime fasting. One sample was collected into serum separator tube and was centrifuged at  $1500 \times G$  for 10 min at  $4^\circ C$ . Glucose was measured in serum using a Miura 200 Auto analyzer (Diamond Diagnostics, Holliston MA, USA) employing commercial kit (I.S.E., Freiburg Breisgau, Germany). The other sample tube supplemented with EDTA was used for blood collection. Ten  $\mu l$  of EDTA-blood were used for HbA1c quantification in a Miura 200 Auto analyzer and the remnant was used to obtain plasma for insulin evaluation and for erythrocytes isolation by centrifugation of  $1500 \times G$  for 10 min at  $4^\circ C$ . Insulin was determined in an ARCHITECT auto analyzer (Abbot, Lake Forest IL, USA). A homeostasis model assessment (HOMA2) calculator was used to calculate HOMA2-IR (estimates insulin resistance), HOMA-S (estimates insulin sensitivity) and HOMA-B (estimates steady state beta cell function) indices and can be found at the following website: <http://www.dtu.ox.ac.uk/index.php?maindoc=/homa/> (Wallace et al., 2004).

The white phase cells was removed and erythrocytes were washed twice with cold saline solution (154 mmol/l) and hemolysates with double distilled water (1:5 cells-water) and centrifuged at  $1500 \times G$  for

10 min at  $4^\circ C$ . Lysates from erythrocytes were used to determine the enzyme activity of ALDH, SOD, CAT and GPx as well as the reactive oxygen species and TBARS levels by spectrophotometric or fluorometric methods.

### 2.3. Activity of antioxidant enzymes in erythrocytes hemolysates

ALDH activity was determined by measuring the generation of NADH at 340 nm (Rawles et al., 1987). The enzyme activity was expressed as U/mg hemoglobin. SOD activity was determined using the reduction of nitroblue-tetrazolium to formazan that is detectable at 586 nm. One unit of SOD was defined as the amount of protein that inhibits NBT reduction by 50% (Oberley and Spitz, 1984). The enzyme activity was expressed as U/mg protein. CAT activity was determined by measuring the consumption of hydrogen peroxide at 240 nm (Aebi, 1984), the enzyme activity was expressed as  $\kappa$ /mg protein. The activity of GPx was determined measuring the consumption of NADPH at 340 nm. One unit of GPx was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1  $\mu$ mol of NADPH/min, the enzyme activity was expressed as U/mg protein (Barrera et al., 2003). The total protein content was determined using the colorimetric method of Lowry et al. (1951).

### 2.4. Oxidative stress markers levels in erythrocytes hemolysates

Reactive oxygen species are formed by the incomplete reduction of oxygen and a fluorometric assay, based on the oxidation of 2-dichlorodihydrofluorescein diacetate to 2, 7-dichloro-fluorescein was employed to detect them. Results were expressed in arbitrary fluorescence units. Fluorescent signals were recorded at excitation and emission wavelengths of 488 and 532 nm, respectively (Silva-Adaya et al., 2008). Lipoperoxidation was determined by TBARS assay as products of the polyunsaturated fatty acids decomposition react with thiobarbituric acid. This controlled reaction was quantified spectrophotometrically at 532 nm (Reznick and Packer, 1994).

### 2.5. Statistical analyses

Reduction of the dimension of the data was performed on variables with missing data. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad, San Diego, USA). Spearman correlation test, Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test followed by the multiple comparison test proposed by Dunn were used. Data were shown as the median (minimum-maximum) or as mean  $\pm$  S.E.M. Logistic regression analysis (Tabachnick and Fidell, 2012) was performed using STATA 12 (StataCorp, College Station, TX, USA). Data were shown as Odds Ratio (OR) and 95% confidence interval,  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Clinical characteristics

After applying inclusion and exclusion criteria, 422 subjects were included in the study. The classification of participants was conducted to determine some characteristics of diabetic patients with treatment or without treatment, diabetic patients with glycemic control and diabetic patients without glycemic control. The values are shown in Table 1. The average time from diagnosis of diabetes was 8.0 (0–30) years. Woman predominance (55%) was found in recruited population. Treatment was: glibenclamide (4 patients), insulin (15 patients), metformin (37 patients), glibenclamide/metformin (23 patients), insulin/metformin (45 patients) and glibenclamide/insulin/metformin (2 patients).

### 3.2. Antioxidant enzymes

ALDH, SOD, CAT and GPx activities were significantly higher in D

**Table 1**  
Clinical profile of healthy individuals and patients with type 2 diabetes.

CT		D					P
(n=256)		(n=166)					
		D NT (n=41)		D T (n=125)			
				D T C1 HbA1c ≤5.6 (n=20)	D T C2 HbA1c 5.7–6.4 (n=31)	D T NC1 HbA1c 6.5–7.5 (n=26)	D T NC2 HbA1c ≥7.6 (n=48)
Age (years)	48 (35–79)	55 <sup>a</sup> (35–82)	59 <sup>a</sup> (47–73)	56 <sup>a</sup> (36–80)	60 <sup>a</sup> (42–73)	56 <sup>a</sup> (39–73)	< 0.0001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28 (18–50)	29 (19–45)	29 (19–42)	29 (25–40)	30 (20–41)	29 (19–38)	0.1504
Glucose (mg/dL)	90 (70–99)	152 <sup>a</sup> (75–298)	115 <sup>a</sup> (82–155)	122 <sup>a</sup> (70–229)	127 <sup>a</sup> (80–164)	199 <sup>a</sup> (70–487)	< 0.0001
HbA1c (%)	4.7 (3–7.4)	6.6 <sup>a</sup> (4.3–12)	5.3 (4.0–5.6)	6.0 <sup>a</sup> (5.7–6.4)	7.1 <sup>a,c</sup> (6.5–7.6)	9.6 <sup>a,b,c,d</sup> (6.8–14)	< 0.0001
Insulin (μU/ml)	11 (2.3–146.4)	15 (3.6–68.6)	13 (3.9–26.1)	12 (4.6–23.2)	23 <sup>a</sup> (3.6–55.9)	26 <sup>a</sup> (1.2–107.6)	< 0.0001
HOMA2-IR	1.35 (0.3–15.15)	2.15 <sup>c</sup> (0.56–10)	ND	ND	ND	ND	< 0.0001
HOMA2-S	99 (7–341)	69 <sup>e</sup> (10–179)	ND	ND	ND	ND	< 0.0001
HOMA2-B	121 (52–683)	70 <sup>e</sup> (12–254)	ND	ND	ND	ND	< 0.0001

CT: control subjects, D: type 2 diabetes patients, D NT: type 2 diabetes patients without hypoglycemic treatment, D T: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment, D T NCT: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment and without glycaemic control, D T CT: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment and glycaemic control, BMI: body mass index, HbA1c: glycated hemoglobin, HOMA2-IR: homeostasis model assessment - insulin resistance, HOMA2-S: insulin sensitivity, HOMA2-B: state beta cell function. Mean (minimum-maximum), Kruskal-Wallis test followed by Dunn test.

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs CT,

<sup>b</sup>  $P < 0.05$  vs D NT,

<sup>c</sup>  $P < 0.05$  vs D T C1,

<sup>d</sup>  $P < 0.05$  vs D T C2. Mann-Whitney test

<sup>e</sup>  $P < 0.05$  vs CT.

T NCT (67%, 25%, 16% and 66%, respectively), and D T NC2 (124%, 36%, 10% and 109%, respectively) than those of the CT group. ALDH and SOD activities remained significantly high in D T C2 (82% and 25%, respectively) than the CT group. ALDH was significantly higher in D T C1 (77%) compared to CT group (Fig. 1A to D).

### 3.3. Oxidative stress markers

TBARS levels were significantly higher in D NT (66%) than those found in CT group. Reactive oxygen species and TBARS levels were significantly higher in D T C2 (41% and 34%, respectively), D T NC1 (64% and 36%, respectively) and D T NC2 (41% and 59%, respectively) than those detected in the CT group (Fig 1E and F).

The association of the parameters with treatment showed correlations with glucose and HbA1c, parameters that indicate how is the patient's glycaemic control (Table 2). Multivariate logistic regression analysis was performed after adjusting by age, gender, glucose, HbA1c and insulin to evaluate antioxidant enzyme activities and oxidative stress markers on type 2 diabetes and hypoglycemic treatment in type 2 diabetes. TBARS and ALDH were significantly associated to type 2 diabetes. ALDH and SOD activities were significantly associated to hypoglycemic treatment in type 2 diabetes. TBARS was significantly associated to the glycaemic control (Table 3).

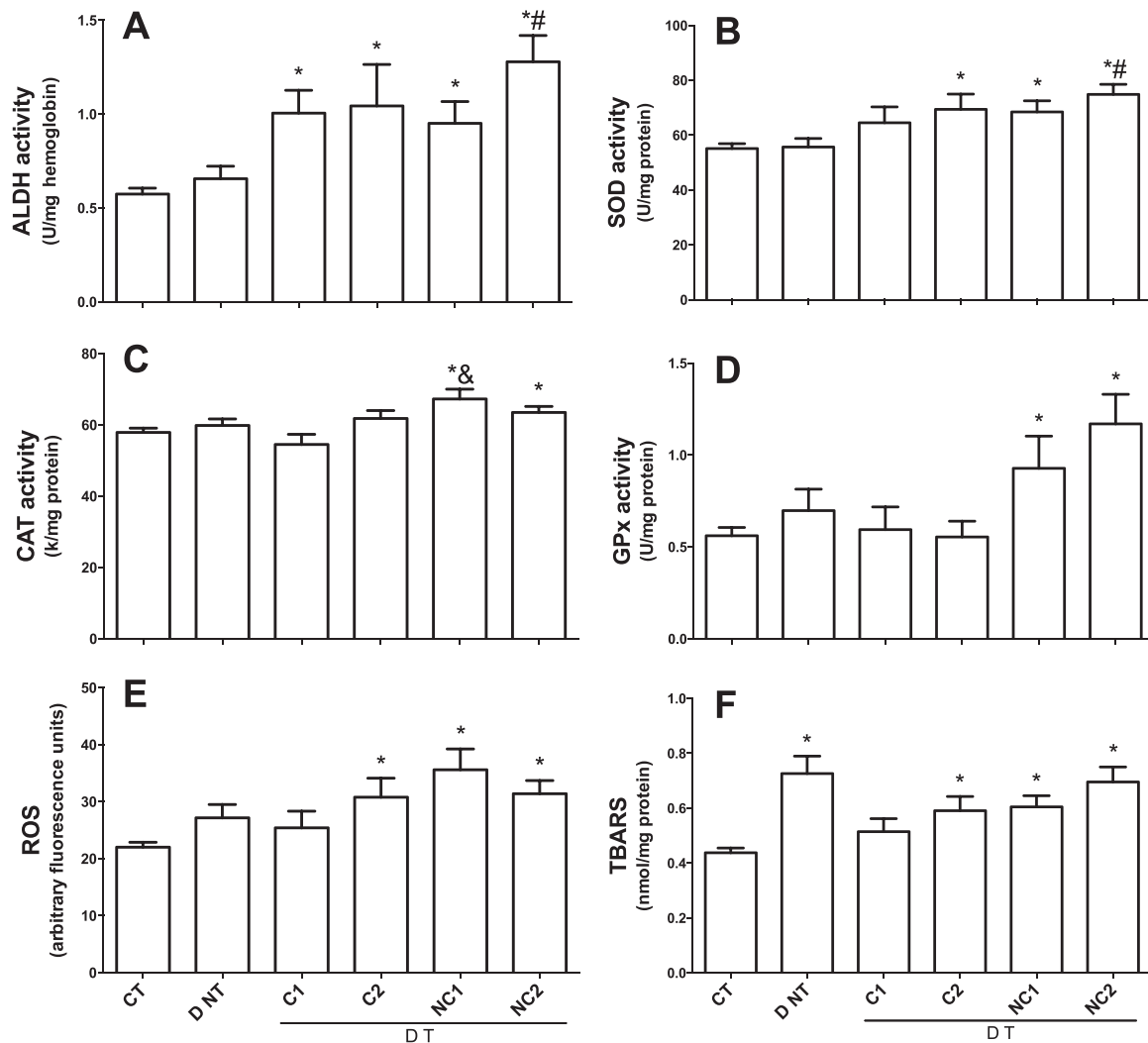
## 4. Discussion

For the last two decades it has been established that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of diabetes and secondary complications (Aouacheri et al., 2015; Araki and Nishikawa, 2010; Huri et al., 2015; Matough et al., 2012, 2011). Giebultowicz et al. (2014) determined that blood ALDH activity is significantly higher in diabetic patients with a positive relationship between ALDH activity

and HbA1c concentrations and association of ALDH with diabetes. In the present study, the activity of ALDH and other enzymes involved in the antioxidant defense as well as oxidative stress markers in erythrocytes from normal subjects and type 2 diabetes patients (with and without hypoglycemic treatment; with and without glycaemic control) were evaluated.

The patients with type 2 diabetes showed a classic clinical profile; increased glucose (152 mg/dl) and HbA1c (6.6% (49 mmol/mol)). Despite we did not find a significant increase of insulin concentration, HOMA2 indexes (Walace et al., 2004) showed evidence of increased insulin resistance (HOMA2-IR), decreased insulin sensitivity (HOMA2-S) and decreasing reserve insulin (HOMA2-B). In these patients DM2 untreated, TBARS was the only parameter with a significant increase, all other parameters evaluated, including ALDH, showed a slightly increase (without statistical significance). However, the logistic regression analysis showed an association of TBARS and ALDH with diabetes. This finding is consistent with the reported by other groups (Aouacheri et al., 2015, Bandeira et al., 2012, Giebultowicz et al., 2014, Huri et al., 2015, Kopprasch et al., 2006, Matough et al., 2012, Singh et al., 2013 and Waggiallah and Alzohairy, 2011).

Results from patients with diabetes of the untreated group showed high statistical variability, suggesting that the patients had different time course with the disease. It is possible that patients with a longer diabetes history could show a higher levels of the parameters, as those found in patients with diabetes and hypoglycemic treatment (increased all enzymatic activities and stress markers). In this case, increased reactive oxygen species may produce the oxidation of a diversity of molecules, including lipids. This increase of oxidized lipids (evaluated by TBARS) induces increased ALDH activity that metabolizes some products of lipid peroxidation (Singh et al., 2013). The increased reactive oxygen species also induce higher activities of the main



**Fig. 1.** Antioxidant enzyme activities and oxidative stress markers in erythrocyte lysates. A. ALDH: aldehyde dehydrogenase, B. SOD: superoxide dismutase, C. CAT: catalase, D. GPx: glutathione peroxidase, E. ROS: reactive oxygen species, F. TBARS: thiobarbituric acid reactive substances. CT: control subjects, D NT: type 2 diabetes patients without hypoglycemic treatment, D T: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment, D T NCT: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment and without glycemic control (HbA1c  $\geq 6.5\%$ ), D T CT: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment and glycemic control (HbA1c  $< 6.5\%$ ). Mean  $\pm$  S.E.M., Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ) followed by Dunn test. \* $P < 0.05$  vs CT, # $P < 0.05$  vs D NT, & $P < 0.05$  vs D T C1.

**Table 2**

Correlations of antioxidant enzyme activities, oxidative markers and clinical parameters with ALDH activity and glucose and HbA1c levels.

	ALDH	Glucose	HbA1c
	R <sup>2</sup> (P)	R <sup>2</sup> (P)	R <sup>2</sup> (P)
ALDH		0.1962 (< 0.0001)	0.3730 (< 0.0001)
SOD	0.2336 (< 0.0001)	0.2072 (< 0.0001)	0.3046 (< 0.0001)
CAT	0.0662 (0.1744)	0.1193 (0.0142)	0.2033 (< 0.0001)
GPx	0.1541 (0.0015)	0.1915 (< 0.0001)	0.2503 (< 0.0001)
ROS	0.3179 (< 0.0001)	0.1540 (0.0015)	0.3108 (< 0.0001)
TBARS	-0.0726 (0.1366)	0.3043 (< 0.0001)	0.2735 (< 0.0001)
Glucose	0.1962 (< 0.0001)		0.6020 (< 0.0001)
HbA1c	0.3730 (< 0.0001)	0.6020 (< 0.0001)	
Insulin	0.1163 (0.0234)	0.3306 (< 0.0001)	0.3296 (< 0.0001)
Age	0.3116 (< 0.0001)	0.2867 (< 0.0001)	0.4615 (< 0.0001)
BMI	-0.0635 (0.1940)	0.1642 (< 0.0001)	0.1297 (0.0107)

ALDH: aldehyde dehydrogenase, SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase, ROS: reactive oxygen species, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, BMI: body mass index, HbA1c: glycated hemoglobin. Spearman correlation test,  $P < 0.05$ . The analysis includes healthy individuals (n=256) and patients with type 2 diabetes (n=166).

**Table 3**

Associations with type 2 diabetes, hypoglycemic treatments and glycemic control.

Groups analyzed	Variable	OR	P	95% Conf. Interval
CT (0), D NT (1)	TBARS	18.5656	< 0.0001	6.2076–55.5262
	ALDH	2.7363	0.002	1.4664–5.1061
<b>R<sup>2</sup> 0.1810, P &lt; 0.0001, n 297</b>				
CT (0), D (1)	TBARS	16.2550	< 0.0001	6.7018–39.42612
	ALDH	4.1727	< 0.0001	2.7094–6.4262
	SOD	1.0088	0.05	0.9999–1.0177
<b>R<sup>2</sup> 0.2294, P &lt; 0.0001, n 422</b>				
D NT (0), D T (1)	ALDH	2.7221	0.010	1.2703–5.8333
	SOD	1.0316	0.006	1.0089–1.0549
<b>R<sup>2</sup> 0.1719, P &lt; 0.0001, n 166</b>				
D T NC (0), D T C (1)	TBARS	2.7221	0.010	1.2703–5.8333
<b>R<sup>2</sup> 0.1146, P 0.0102, n 125</b>				

CT: control subjects, D: type 2 diabetes patients, D T: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment, D NT: type 2 diabetes patients without hypoglycemic treatment, D T C: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment and glycemic control, D T NC: type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment and without glycemic control, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, ALDH: aldehyde dehydrogenase, SOD: superoxide dismutase, OR: Odd ratio. Multivariate logistic regression,  $P < 0.05$ .



enzymes (SOD, CAT and GPx) that metabolize them (Spanidis et al., 2016). However, the multivariate logistic regression analysis showed that only ALDH and SOD activities had a significant association with the hypoglycemic treatment in type 2 diabetes patients. When we classified patients in 4 groups depending on their glycemic control, we found that those with strict glycemic control (HbA1c  $\leq$ 5.6% (38 mmol/mol)) have a profile (clinical, antioxidant enzymes and stress markers) similar to control subjects, with the exception of ALDH activity, which remained high. Also, we found differences between glycemic control groups in SOD activity, reactive oxygen species and TBARS levels. The presence of high ALDH and SOD activities in type 2 diabetes patients with glycemic control (HbA1c  $\leq$ 6.4% (47 mmol/mol)) may be to avoid a significant damage due to the increase in reactive oxygen species and TBARS. It is possible that this new balance of antioxidant enzymes is the mechanism against oxidative stress that prevents the development of the classical complications of diabetes (Araki and Nishikawa, 2010; Shen, and Matough et al., 2012).

In contrast, the patients with hypoglycemic treatment without glycemic control (56%, HbA1c  $\geq$ 6.5% (48 mmol/mol)) showed higher levels of enzymatic activities and oxidative stress markers. These results were congruent with the correlations found, where all parameters evaluated in this work had a significant correlation with glucose or HbA1c (Table 2) suggesting that the lower glycemia or the higher glycemic control, the lower levels of oxidative stress and antioxidant enzyme activities will be found in subjects with type 2 diabetes. On the other hand, TBARS was the only one parameter significantly associated to glycemic control, suggesting that the damage due to oxidative stress should be low in order to have a metabolic control.

Different controlled clinical trials with a continuous monitoring of treatment, found an improved antioxidant defense in type 2 diabetes patients with metformin alone and metformin combined with other hypoglycemic drugs in combination. Malondialdehyde levels increased, SOD and CAT activities decreased and GPx activity remained unchanged in erythrocytes, whereas in plasma of type 2 diabetes patients, the malondialdehyde levels, SOD and CAT activities decreased; and GPx activity remained with no changes. The four-week treatment with metformin caused the return to basal parameters (Pavlović et al., 2000). Ghadge et al. (2015) determined that the SOD activity increased and CAT activity decreased in serum of type 2 diabetes patients treated with metformin alone or with other hypoglycemic drugs.

In this study we concluded that the treatment (prescribed by their doctor) was inadequate in most of our patients (56%), resulting in lack of glycemic control. This situation puts patients at high risk for complications that will generate a greater economic cost to the patient and the health system. The national health survey 2012, reports that the prevalence of diabetes in Mexico is 9.1%. The frequency of patients taking oral drugs is 72.5%, from which only 25% had treatment for metabolic control (Gutiérrez et al., 2012).

This paper supports other findings and contributes determining the association of ALDH activity with hypoglycemic treatment. Also, it shows for the first time the ALDH activity in Mexican population. In addition, we propose that patients should have a strict glycemic control to reduce oxidative stress, which gives a better prognosis avoiding complications. Our health system must improve the monitoring of diabetic patients in order to determine the best treatment for each one. Thus, the ideal therapy for diabetes would be a treatment that not only possesses hypoglycemic effect, but also enhances or protects the antioxidant defense system, which is usually involved (ADA, 2014; Araki and Nishikawa, 2010; Esteghamati et al., 2013; Shen, 2012).

Further clinical and genetic studies are needed to explain the observed changes in antioxidant enzyme activities and oxidative stress markers at the beginning, permanence and complications of the disease.

In conclusion, this work determined significantly higher ALDH and SOD activities associated to hypoglycemic therapy. Type 2 diabetes patients with hypoglycemic treatment and glycemic control showed an

improved stress status than patients without glycemic control, which could help to prevent the development of complications.

## 5. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest to disclose.

## Acknowledgements

This work was supported by “PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA” UNAM-DGAPA-PAPIIT IN211713 (D.B.O.) and partially by CONACYT-SALUD 2013-01 201519 (J.P.C.). Authors thank to the Hospital Regional Adolfo López Mateos ISSSTE, the Clínica de Detección y Diagnóstico Automatizado (CLIDDA), Hospital General de México and medico-familiar clinics of the ISSSTE zona sur: Fuentes Brotantes, Del Valle, Ignacio Chávez and Xochimilco for the recruitment of the sample used in this study. A. P. thanks to “Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud”, UNAM and to CONACYT for PhD fellowship 162708. Authors thank to María de Lourdes Castro Guerrero and Dr. Tanya Plett Torres for their help in reviewing the writing of this manuscript.

## References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- American Diabetes Association, 2014. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 37, S14–S80. <http://dx.doi.org/10.2337/dc14-S014>.
- Aouacheri, O., Saka, S., Krim, M., Messaadia, A., Maida, I., 2015. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Can. J. Diabetes* 39, 44–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcjd.2014.03.002>.
- Araki, E., Nishikawa, T., 2010. Oxidative stress: a cause and therapeutic target of diabetic complications. *J. Diabetes Investig.* 1, 90–96. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00013.x>.
- Bandeira Sde, M., Guedes Gda, S., da Fonseca, L.J., Pires, A.S., Gelain, D.P., Moreira, J.C., Rabelo, L.A., Vasconcelos, S.M., Goulart, M.O., 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. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/819310>.
- Barrera, D., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.E., Pedraza-Chaverrí, J., 2003. Protective effect of SnCl<sub>2</sub> on K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced nephrotoxicity in rats: the indispensability of HO-1 preinduction and lack of association with some antioxidant enzymes. *Life Sci.* 73, 3027–3041.
- Chakraborty, A., Chowdhury, S., Bhattacharyya, M., 2011. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, 56–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2010.11.030>.
- Chen, C.H., Ferreira, J.C., Gross, E.R., Mochly-Rosen, D., 2014. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol. Rev.* 94, 1–34. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00017.2013>.
- Esteghamati, A., Eskandari, D., Mirmiranpour, H., Noshad, S., Mousavizadeh, M., Hedayati, M., Nakhjavani, M., 2013. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve inpatients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clin. Nutr.* 32, pp. 179–185. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2012.08.006>.
- Ghadge, A., Harkar, S., Khadke, S., Diwan, A., Pankaj, M., Kulkarni, O., Ranjekar, P., Harsulkar, A., Kuvalekar, A.A., 2015. Effects of commonly used antidiabetic drugs on antioxidant enzymes and liver function test markers in type 2 diabetes mellitus subjects - pilot study. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 123, 500–507. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1554654>.
- Giebultowicz, J., Solobodowska, S., Bobilewicz, D., Wroczynski, P., 2014. Blood ALDH1 and GST activity in diabetes type 2 and its correlation with glycosylated hemoglobin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 122, 55–59. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1361177>.
- Gutiérrez, J.P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Hernández-Ávila, M., 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX). (<http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>) (accessed 16.12.02).
- Huri, H.Z., Ling, D.Y., Ahmad, W.A., 2015. Association between glycemic control and antidiabetic drugs in type 2 diabetes mellitus patients with cardiovascular complications. *Drug Des. Devel. Ther.* 18, 4735–4749. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S87294>.
- Kopprasch, S., Srirangan, D., Bergmann, S., Graessler, J., Schwarz, P.E., Bornstein, S.R., 2006. Association between systemic oxidative stress and insulin resistance/sensitivity indices – the PREDIAS study. *Clin. Endocrinol.* 84, 48–54. <http://dx.doi.org/10.1111/cen.12811>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement

- with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N., Mohamed, J., 2012. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 12, 5–18.
- Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R., Zinman, B., American Diabetes Association, European Association for Study of Diabetes. 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 32, 193–203. <http://dx.doi.org/10.2337/dc08-9025>.
- Oberley, L.W., Spitz, D.R., 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105, 457–464.
- Pavlović, D., Kocić, R., Kocić, G., Jevtović, T., Radenković, S., Mikić, D., Stojanović, M., Djordjević, P.B., 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.
- Phung, O.J., Scholle, J.M., Talwar, M., Coleman, C.I., 2010. Effect of noninsulin antidiabetic drugs added to metformin therapy on glycemic control, weight gain, gain, and hypoglycemia in type 2 diabetes. *JAMA* 303, 1410–1418. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2010.405>.
- Rawles, J.W., Rhodes, D.L., Potter, J.J., Mezey, E., 1987. Characterization of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 36, 3715–3722.
- Reznick, A.Z., Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233, 357–363.
- Robertson, R.P., 2009. Beta-Cell deterioration during diabetes: what's in the gun? *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 388–393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2009.05.004>.
- Shen, G.X., 2012. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 12, 106–112.
- Silva-Adaya, D., Cruz, P.érez-De. La, Herrera-Mundo, V., Mendoza-Macedo, M.N., Villeda-Hernández, K., Binienda, J., Ali, Z., Santamaría, A, S.F., 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of l-carnitine. *J. Neurochem.* 105, 677–689. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05174.x>.
- Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B.C., Matsumoto, A., Thompson, D.C., Vasiliou, V., 2013. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic. Biol. Med.* 56, 89–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010>.
- Spanidis, Y., Mpesios, A., Stagos, D., Goutzourelas, N., Bar-Or, D., Karapetsa, M., Zakynthinos, E., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A.M., Leon, G., Kouretas, D., 2016. Assessment of the redox status in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes reveals great variations. *Exp. Ther. Med.* 11, 895–903. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2016.2968>.
- Tabachnick, B.G., Fidell, L.S., 2012. *Using Multivariate Statistics* 6th ed. Pearson.
- Turk, H.M., Sevinc, A., Camci, C., Cigli, A., Buyukberber, S., Savli, H., Bayraktar, N., 2002. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 39, 117–122. <http://dx.doi.org/10.1007/s005920200029>.
- Waggiallah, H., Alzohairy, M., 2011. The effect of oxidative stress on human red cells glutathione peroxidase, glutathione reductase level, and prevalence of anemia among diabetics. *N. Am. J. Med. Sci.* 3, 344–347. <http://dx.doi.org/10.4297/najms.2011.3344>.
- Walace, T.M., Levy, J.C., Matthews, D.R., 2004. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes care* 27, 1487–1495.