



**UNLP**

Universidad Nacional de La Plata

## **TESIS DOCTORAL**

***Metabolismo de lípidos y disfunción endotelial en pacientes diabéticos tipo 2 tratados con insulina o hipoglucemiantes orales***

**Doctorando**

***Médico Fernando Ariel Marra***

**- 2013 -**

**Director de la Carrera y del trabajo de Tesis Doctoral**

Prof. Dr. Carlos Alberto Marra  
Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP

**Co-Director**

Prof. Dra. María J. Tacconi de Alaniz  
Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP

**INSTITUCIONES INTERVINIENTES**

Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP  
Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular



Consejo Nacional de Investigaciones  
Científicas y Tecnológicas



Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata



Clínica Privada Althea

## Reconocimientos

A la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, y al INIBIOLP, por haberme brindado los medios materiales necesarios para la ejecución de este trabajo.

A todo el personal administrativo, técnico y científico de las Instituciones intervinientes por haber colaborado desinteresadamente en la ejecución de esta tesis doctoral.

A los miembros del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas (COBIMED) y a los Sres. Miembros del Jurado, por la evaluación de los protocolos experimentales, del plan de trabajo, de los informes parciales, y del trabajo final; por su valioso tiempo y sus oportunos consejos.

A los Docentes de la Casa de Estudios que me han formado en esta maravillosa Profesión.

## Agradecimientos

A mi esposa María Celeste por haberme apoyado durante toda la prosecución de este proyecto, por las horas restadas a su invaluable e insustituible compañía, y por su estímulo constante e incondicional.

A toda mi familia que siempre ha sido el pilar en donde sustentar mi vida en el sentido más amplio de lo que esto pudiera significar.

Al Profesor Doctor Carlos Alberto Marra que ha dirigido mi Carrera de Postgrado y el presente trabajo de Tesis Doctoral, quien puso a mi entera disposición su invalorable capacidad científica, su guía y oportunos consejos, y su profesionalismo.

A la Profesora Doctora María Josefa Tacconi de Alaniz, que me brindó su constante estímulo, y su excelente predisposición generando un clima de agradable trabajo en equipo.

A la Prof. Dra. Diana Olga Cristalli, por haber compartido la tarea de seleccionar controles sanos para este estudio, y al Prof. Dr. Armando Cervantes Sandoval por su asesoramiento en el análisis estadístico.

Muy especialmente agradezco al personal Técnico del INIBIOLP, María Cristina Pallanza de Stringa, Norma Cristalli de Piñero, y Eva Illara de Bozzolo; y a los integrantes del laboratorio de la Clínica Althea en la persona del Dr. Guillermo Docena y su equipo técnico-profesional por haberme brindado su desinteresado apoyo.

A mis amigos y colegas, a todos mis seres queridos (los que están, y los que se han ido pero me han dejado sus enseñanzas y su siempre vigente cariño). A todos por su participación y sus consejos; y por el afecto demostrado a diario que se constituyó en el motor para impulsar esta empresa.

## **Dedicatorias**

Dedico este trabajo de Tesis Doctoral a todos mis pacientes.

Hago propio su sufrimiento, y deseo fervientemente que la ciencia pueda mitigarlo en una progresiva lucha hasta la cura de una enfermedad que azota a la Humanidad con características pandémicas. Les reconozco y agradezco la buena voluntad que han tenido al colaborar con la realización de este trabajo.

También dedico el esfuerzo que he puesto en las horas de estudio y de labor a mis cuatro hijas, Florencia, Candela, Antonella y Morena; quienes fueron una inspiradora fuente de estímulo para lograr la concreción de este proyecto. Espero que les sirva como un modelo para entender la importancia de luchar por la concreción de sus sueños, sobre todo cuando esos sueños tienen la finalidad de ayudar a los demás.

## Trabajos derivados de esta tesis

“Biomarcadores de aterogénesis y disfunción endotelial en pacientes diabéticos tipo II tratados con hipoglucemiantes orales y/o insulino terapia”.

Marra, Fernando Ariel; Alaniz, María J. Tacconi de; Marra, Carlos Alberto.

VI Jornadas de Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas (comunicación oral). UBA, Julio, 2012.

“Evidencia experimental que soporta la conveniencia de la terapia combinada con insulina e hipoglucemiantes orales en pacientes diabéticos de tipo 2”.

Marra, Fernando Ariel; Alaniz, María J. Tacconi de; Marra, Carlos Alberto.

V Jornadas de Trabajos de Investigación en Medicina. UNLP, Octubre de 2012.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se presentaron con el título:

“Biomarcadores de disfunción endotelial y aterogénesis en pacientes diabéticos tipo II tratados con hipoglucemiantes orales y/o insulino terapia”, como Trabajo Final evaluado en el examen de *Especialista en Medicina Interna*, presentado en la Asociación Médica Argentina.

“Biomarkers of lipid metabolism and endothelial dysfunction in type 2 diabetes patients under oral hypoglycaemic treatment associated or not with insulin therapy”.

Marra, Fernando Ariel; Alaniz, María J. Tacconi de; Marra, Carlos Alberto.

Hormone and Metabolic Research (aceptado, Feb., 2013).

## Índice general

1.- Introducción .....	Pag. 9
2.- Hipótesis experimental .....	Pag. 30
3.- Objetivos generales y específicos .....	Pag. 32
4.- Materiales y métodos .....	Pag. 34
5.- Resultados .....	Pag. 45
6.- Discusión .....	Pag. 75
7.- Conclusiones .....	Pag. 97
8.- Referencias bibliográficas .....	Pag. 100
9.- Anexo .....	Pag. 114

## Abreviaturas

AGEs: productos avanzados de glicosilación

AGL: ácidos grasos libres

AN: adiponectina

CRP: ceruloplasmina

CT: colesterol total

DiEnDi: disfunción endotelial asociada a diabetes tipo 2

DM2: diabetes mellitus tipo II

EMAGs: ésteres metílicos de ácidos grasos

ET-1: endotelina-1

FA(s): ácido(s) graso(s)

EMAGs: ésteres metílicos de ácidos grasos

Fib: fibrinógeno

FRAP: ensayo de capacidad reductora férrica en plasma

HCys: homocisteína

HO: hipoglucemiantes orales

HOMA: del Inglés *homeostasis model assessment*

IL-1 $\beta$ : interleuquina 1 beta

Ins: insulina

LP(a): lipoproteína "a"

NOx: suma de nitratos + nitritos, expresada como nitritos totales

Ox-LDL: lipoproteína de baja densidad peroxidada

PCRus: proteína C reactiva ultrasensible

PCs: carbonilos proteicos

SiRIns: síndrome de resistencia periférica a la insulina

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TBX-B2: tromboxano B2

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1

vWF: factor von Willebrand

c-GLC: cromatografía capilar gas-líquido

*(Otras abreviaturas utilizadas esporádicamente se aclaran en el mismo texto, o en las figuras y tablas).*



## Introducción

---

*"Después de tantos meses de arduo trabajo y una montaña de apuntes, me pareció que las pocas páginas que contenían la esencia de tantos secretos no justificaban el esfuerzo realizado.*

*Entonces encontré consuelo al recordar que se necesitan varias toneladas de mineral para purificar algunos gramos de oro.*

*Subsecuentemente, tomé todos esos descubrimientos y los utilicé a mi manera".*

*- Og Mandino -*

# 1.- Introducción

## 1.1.- Sociedad y diabetes tipo II (DM2)

Muchos avances socioeconómicos y científico-tecnológicos han provocado un tremendo impacto en la prolongación de la expectativa de vida durante la última centuria. Sin embargo, y paradójicamente, hemos desarrollado un estilo de vida más sedentario asociado con malos hábitos dietarios que incrementaron dramáticamente las complicaciones derivadas de las enfermedades metabólicas que involucran a lípidos y carbohidratos. La Organización Mundial de la Salud (OMS), conjuntamente con la Federación Internacional de la Diabetes (IFD), han declarado un estado de pandemia para la obesidad y el síndrome de resistencia a la insulina (SiRIns) (Kohen Avramoglu et al, 2006). En estos momentos, aproximadamente el 6 % de la población mundial es diabética siendo del 90 al 95 % de los casos atribuibles a diabetes mellitus tipo 2 (DM2), antes denominada “no insulino-dependiente” (King et al, 1998; Ruiz y Morosini, 2011). La OMS ha implementado programas de emergencia para contener a esta enfermedad (WHO, 1998) que fue la primera en encabezar la lista de “ECNT” (enfermedades crónicas no transmisibles). Baste decir que a partir de las proyecciones del estudio de King y colaboradores se espera que haya algo más de 300.000 millones de nuevos pacientes con DM2 en la próxima década. La DM2 contribuye de manera importante a la carga total de enfermedades, y se estima que su prevalencia mundial es de 180 millones de casos (de allí que haya alcanzado dimensiones de pandemia) afectando en especial a países en desarrollo o de reciente industrialización. Lamentablemente, se prevé que esta cifra aumente a más del doble al llegar al año 2030 (Wild et al., 2004). Para una revisión de la epidemiología de esta enfermedad (especialmente en América Latina) se recomienda consultar el texto de Ruiz y Morosini (2011).

La DM2 se asocia a un exceso de costos por asistencia sanitaria debidos en gran parte a complicaciones de naturaleza cardiovascular (ECV, o enfermedad cardiovascular aterosclerótica). Se sabe que en las personas diabéticas, la ECV en todas las formas de complicación micro y macrovascular, es la causa de hasta un 80 % del total de muertes y de un porcentaje aún mayor de incapacidad (NIH, 1995; Brown et al, 1999; Gallard et al, 2006). Los principales factores de riesgo cardiovascular tradicionales, como hipertensión, tabaquismo y el sedentarismo - que derivan en un estado pro-coagulante - explican en parte el aumento de riesgo de

ECV en la DM2. A los factores de riesgo *clásicos* de enfermedad aterosclerótica denominados no modificables como lo son el sexo, la edad, la raza y la susceptibilidad genética, y los modificables tales como hipertensión arterial (HTA), hiperlipidemia, tabaquismo, obesidad y sedentarismo; se han sumado otros específicamente asociados a DM2 y de ponderación independiente a los anteriores como la hiperinsulinemia y el SiRIns, la hiperfibrinogenemia, la vasculitis y la hiperhomocisteinemia, y se han revalorizado (Ruiz y Morosini, 2011) otros biomarcadores de daño (como la microalbuminuria) propuestos desde la década de los 90 (Rolla, 1994; Verstraete, 1998).

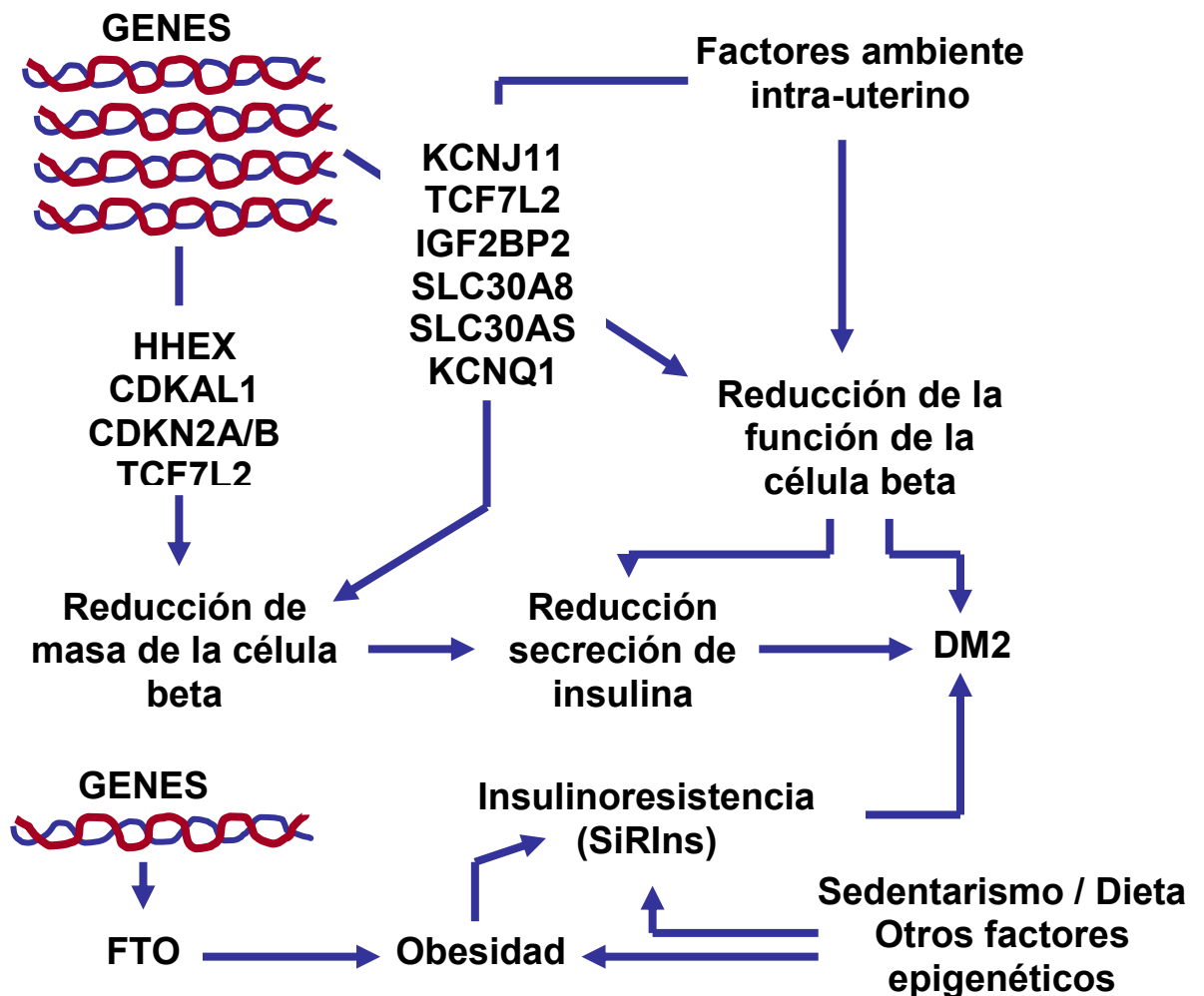
Resulta obvia la relación entre hábitos sociales, condicionamientos económicos, y DM2. La globalización y la diseminación de las malas prácticas en los hábitos higiénico-sanitarios constituyen aspectos cruciales para el desarrollo de la DM2. El riesgo relativo de padecer DM2 aumenta exponencialmente con el incremento del índice de masa corporal (IMC), que provoca una demanda cada vez mayor de secreción de insulina. La obesidad siempre se ha reconocido como una de las causas del síndrome de insulinoresistencia ligado a la DM2 (SiRIns), eso es debido a la exigencia de más hormona para que el tejido adiposo capte y metabolice adecuadamente a la glucosa periférica. Se ha demostrado desde hace muchos años que el 80 % de los pacientes con DM2 son obesos, o presentan diferentes grados de sobrepeso, y asimismo el 60 % de los obesos presentan una tolerancia alterada a la glucosa (WHO, 1998; Pogatsa, 1999).

## **1.2.- Características generales de la DM2 y factores de riesgo concomitantes**

La enfermedad se caracteriza por una serie de alteraciones derivadas de la falta de utilización apropiada de la glucosa como combustible metabólico tisular (o celular) por excelencia. Estas alteraciones se basan en un déficit absoluto o relativo de la actividad biológica de la hormona y/o de fallas en la población de sus receptores derivada de un caída en su densidad efectiva (obesidad como causa prevalente) que conllevan primero a una hipersecreción de insulina de tipo *reactiva* o compensatoria, seguida de una fase de agotamiento de las célula  $\beta$ . Si bien tiene una indudable predisposición genética, es en realidad una dolencia epigenética pues se requiere la concurrencia de varios factores ambientales desencadenantes. Las formas de DM2 monogénicas son muy poco frecuentes e involucran defectos genéticos específicos de las células  $\beta$ . Lo que si es muy frecuente, es la herencia no

mendeliana fuertemente familiar de varios rasgos predisponentes, es decir, de base poligénica. La clínica está muy significativamente asociada a la obesidad, comienzo variable en la adultez, secreción de insulina variable y baja sensibilidad insulínica. En general se observa una mayor afectación de hispanos y afroamericanos (que muy probablemente esté determinada por un conjunto de genes aún no identificados) (Alvarez, 2006). Por lo común, no existen anticuerpos anti-insulina en estos pacientes. Se han descrito varias mutaciones que involucran a los genes HHEX, CDKAI1, CDKN2A/B, TCF7L2, KCNJ11, IGF2BP2, SLC30A8 y KNCQ1, entre otros, que estarían involucrados en la pérdida progresiva de células  $\beta$  funcionales y una resistencia periférica a la insulina (Fig. 1). Varios factores ambientales influirían en el establecimiento final del cuadro de DM2 en la adultez (ver Ruiz y Morosini, 2011; capítulos 6.1 y 6.2).

**Figura 1. Esquema que muestra a los principales genes, integrantes del genoma humano, que se han vinculado a la etiopatogenia de la DM2.**



En suma, la etiopatogenia de esta enfermedad es compleja y continúa siendo discutida en muchos de sus aspectos. Desde los primeros estudios de corte epidemiológico que asociaron el IMC al nacer, el denominado “efecto glucotóxico”, hasta el establecimiento del síndrome X (síndrome de disfunción metabólica), y los mas modernos descubrimientos sobre las UCP-2 (proteínas de desacople mitocondrial asociadas a la DM2), o el rol de numerosos estímulos moduladores de promotores de transcripción (con receptores nucleares como los PPARs, SREBs, etc.), se han elaborado diferentes hipótesis sobre la causa y la evolución de esta enfermedad que en realidad excederían los alcances de esta introducción (Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011).

Si bien la hiperglucemia muy severa y la constitución de un cuadro de cetoacidosis son complicaciones poco frecuentes, ambas pueden aparecer en pacientes DM2 graves, descontrolados, o francamente crónicos. A pesar de esto, la enfermedad no es considerada en absoluto como una dolencia benigna sino más bien todo lo contrario. La falla en los mecanismos de transducción de la señal de insulina hacen que la patología curse crónicamente con severas complicaciones a largo plazo que involucran a todos los tejidos del organismo, con especial impacto en el sistema nervioso (central y periférico), los riñones, la retina, y especialmente el aparato cardiocirculatorio.

Asimismo, la DM2 está acompañada de estrés oxidativo-nitrativo debido a excesiva formación de especies radicalarias (ROS y RNS) e inmunocompromiso del paciente, lo cual contribuye al empeoramiento de infecciones oportunistas que pueden terminar en la amputación de miembros. El estado de estrés oxidativo conduce también a múltiples consecuencias que involucran en especial a cascadas de señalización redox-dependientes, como por ejemplo la sobreactivación de la proteín-kinasa C (PKC), activación de las señales dependientes del factor de transcripción nuclear kappa-beta (NF- $\kappa$ ), hipernitración e hipercarbonilación de proteínas dependientes de la concentración de óxido nítrico, peroxinitrito, superóxido y peróxido (y subsecuente daño al DNA vía poli-ADP-ribosafosforilasa), entre otros efectos (Alvarez, 2006). Muchas de estas señales redox-dependientes provocan serias alteraciones en el metabolismo de polioles, la vía de las hexosaminas, y el propio metabolismo lipídico que se configuran en un cuadro aterogénico y de disfunción del endotelio como órgano endócrino y vasomodulador.

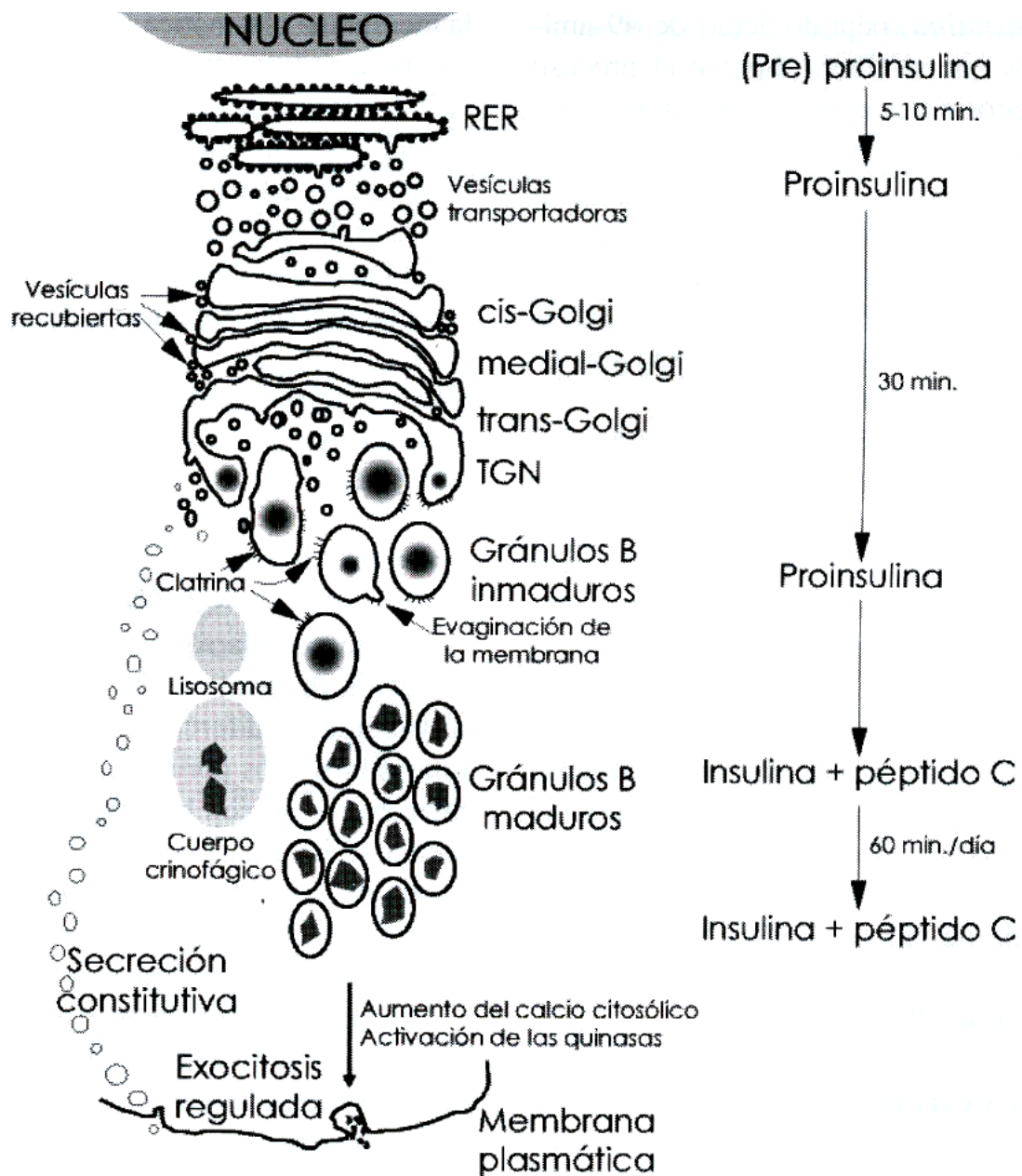
Por otro lado, la hipertensión arterial (HTA) es un desorden que con frecuencia se asocia a la DM2 y su presencia constituye un factor agravante para el

desarrollo y progresión de la retinopatía y de la nefropatía diabéticas, condición -esta última- que predispone a su vez al desarrollo de la insuficiencia renal crónica y al menos duplica el riesgo para desarrollar la enfermedad aterosclerótica. Muchos autores aseguran que el riesgo de aterosclerosis aumenta logarítmicamente con el incremento de los niveles de la presión arterial en los pacientes DM2. Se sabe desde hace tiempo (Reavens, 1988) que el control estricto de la HTA en los pacientes DM2 reduce la morbilidad y la mortalidad por insuficiencia cardíaca, la incidencia de cardiopatía isquémica y las enfermedades o accidentes cerebrovasculares (Moore et al, 1998; Marks y Raskin, 1998; ASH, 1998). También se estableció fehacientemente que el hábito de fumar es uno de los factores de riesgo independientes más potente en la génesis de la aterosclerosis. El efecto del hábito de fumar en los DM2 sobre el riesgo de enfermar o morir por ECV está en relación directa con el número de cigarrillos fumados, con la edad de inicio del hábito tabáquico, con la duración total del hábito, y con la profundidad de la inhalación (ASH, 1998).

### **1.3.- La actividad biológica de la insulina**

La insulina (Ins), como todos los péptidos de secreción obligatoria, se sintetiza como pro-insulina en las células  $\beta$  pancreáticas, munido de una secuencia señal que facilita su direccionamiento hacia el trans-Golgi en donde es secuencialmente hidrolizada por una exo- y una endo-peptidasas que liberan al *péptido conector* de sus dos cadenas (la A de 21 restos de aminoácidos, y la B de 30). Desde allí, es vesiculizada (junto con otras proteínas como la  $\beta$ -granina, la pancreastatina y la amilina) y exportada con un peso molecular de unos 9 kDa hacia la circulación (Fig. 2).

**Figura 2. Esquema simplificado de la ruta de secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas endócrino (adaptado de Ruiz y Morosini, 2011).**

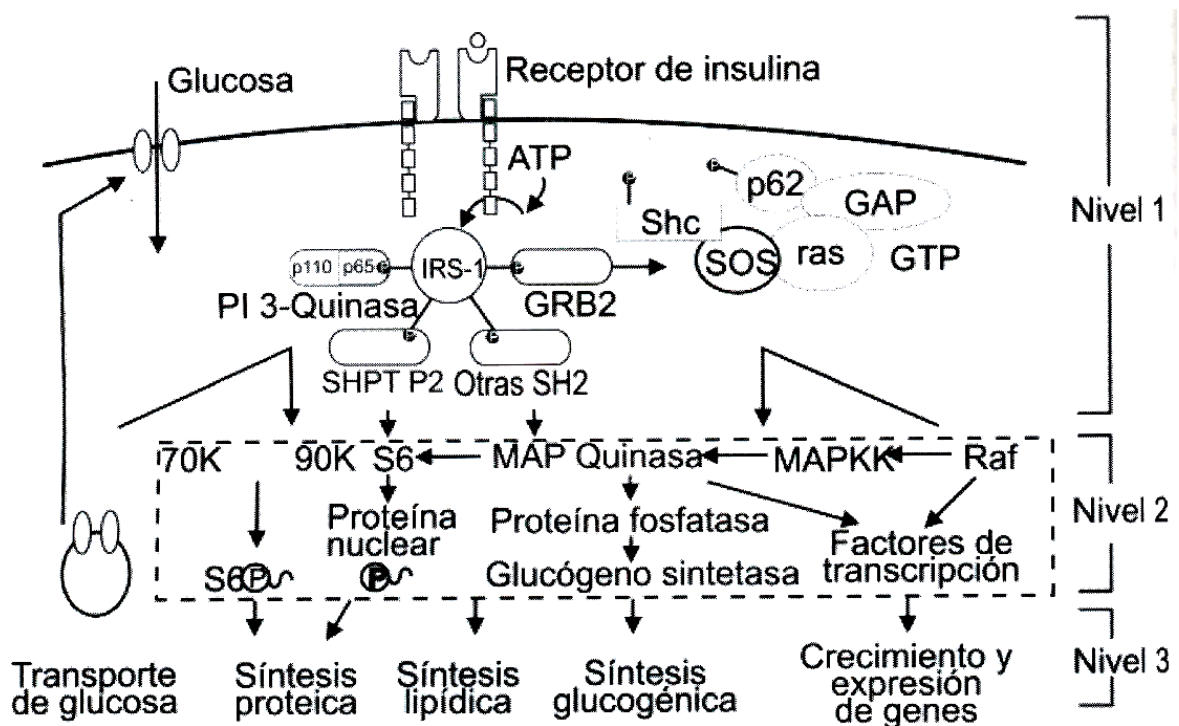


El proceso de secreción está altamente regulado por múltiples señales interdependientes (o sujetas a *cross-talks*) en una compleja red de modulaciones que son influenciadas positiva o negativamente por varias calcio-calmodulin-quinasas, segundos mensajeros nucleotídicos, hormonas peptídicas, hormonas esteroideas, y una serie de intermediarios derivados del metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos.

Los receptores de insulina se localizan predominantemente en la membrana plasmática, son de muy alta especificidad y afinidad, saturables por poseer un número finito de sitios de unión y con una interacción con el ligando sumamente

rápida. Son complejos heterodiméricos compuestos por dos subunidades simétricas unidas por enlaces disulfuro. La subunidad  $\alpha$  es completamente extracelular y allí reside el sitio de unión a Ins, la  $\beta$  es transmembrana con un sector citosólico con actividad de protein-tirosinquinasa. La transducción de la señal luego del acoplamiento y agregación lateral de los complejos Ins-receptor, es muy compleja y aún no del todo dilucidada. A manera de resumen se los esquematizó en la Fig. 3 en donde se muestran los tres estadios de respuesta molecular. Como puede verse, los efectos de la Ins son pleiotrópicos e involucran a numerosos eventos celulares además de los estrictamente vinculados al metabolismo de hidratos de carbono.

**Fig. 3. Ejemplos (simplificados) de las rutas río-abajo en la transducción del acoplamiento insulina-receptor en las células de los tejidos target.**



#### 1.4.- La DM2 y el metabolismo de lípidos

La dislipemia es una característica centinela en la DM2 que comprende conocidas alteraciones tales como la disminución del nivel plasmático de HDL-colesterol, incremento de los ácidos grasos (FAs) libres en plasma, elevación del colesterol VLDL (con incremento concomitante de Apo-B100 y Apo-B48), incremento de lipoproteínas pequeñas y densas reflejadas en un aumento de la concentración de LDL-colesterol, etc.



Desde hace décadas se viene describiendo que en los pacientes con DM2 es frecuente observar un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas, que poseen un alto potencial aterogénico y una disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) con incremento de los triglicéridos (Lewis y Steiner, 1996). También es bien sabido que en pacientes DM2 -con enfermedad cardiovascular o sin ella- se hallan niveles más altos de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL junto con bajos niveles de colesterol HDL. La resistencia insulínica y la hiperinsulinemia son reconocidos como típicos factores de riesgo de la aterosclerosis en este tipo de pacientes. Los pacientes DM2 con hiperinsulinemia en ayunas presentan mucha mayor tendencia a padecer trastornos metabólicos múltiples, de modo que a la hiperinsulinemia se la considera desde hace muchos años como un excelente marcador del estado de resistencia a la insulina (Rolla, 1994). Volveremos sobre esta cuestión más adelante.

Por otro lado, y ya en la década del 80, Jarrett et al (1984) y Morgensen (1987) notificaron por separado que la microalbuminuria (MAU) era un marcador independiente de riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares. Desde entonces, diferentes estudios han confirmado que la MAU predice la mortalidad cardiovascular en los pacientes con DM2. La homeostasis del binomio glucosa-insulina, la MAU, y el metabolismo de las lipoproteínas han recibido particular atención dentro del síndrome de resistencia a la insulina, el cual precede y predice la aparición de DM2 (Syväne y Taskinen, 1997; Tinker et al, 1999). Existen factores de riesgo para la DM2 y enfermedad cardiovascular que se encuentran asociados a la concentración y composición de las diferentes fracciones de las lipoproteínas durante el estado de alimentación (Taskinenn, 2003). En un estudio pionero se ha reportado que una lipemia posprandial alta y prolongada se relaciona con una futura enfermedad coronaria y aterosclerosis carotídea (Clifton y Nestel, 1996). Pero también, y con anterioridad, se habían identificado otros factores que pueden contribuir a producir las manifestaciones específicas de la dislipidemia diabética (Lewis y Steiner, 1995). Uno de ellos lo constituyen las vías catabólicas de las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos (TAG) las cuales dependen fundamentalmente de dos enzimas, la lipoproteinlipasa (LPL) y la lipasa hepática (HL). Ambas desempeñan un papel importante en la regulación de las concentraciones plasmáticas de los TAG. Eckel (1989) fue el primero en establecer que la insulina ejerce un efecto significativo como estimulante de la actividad de la LPL. En muchos estudios se ha descrito que la actividad de LPL es baja en los pacientes con DM2,

mientras que - por añadidura - la de la HL está aumentada (Baynes et al, 1991). Estos cambios fueron ratificados en estudios mas contemporáneos (Ruiz y Morosini, 2011) y son atribuibles a la resistencia a la insulina. Ellos contribuyen a producir un deterioro de la eliminación postprandial de TAG y a un aumento de la lipemia que son característicos de la dislipidemia asociada a DM2, sobre todo en pacientes no tratados o inadecuadamente tratados.

Sin embargo, la dislipemia y cualquiera de todos los otros biomarcadores metabólicos asociados al SiRIns son solo una parte de una compleja constelación de alteraciones metabólicas que está forzando a la ciencia a buscar nuevos evaluadores funcionales mucho más sofisticados y específicos que los tradicionalmente empleados.

El vínculo entre DM2 y riesgo aterogénico está sólidamente establecido desde hace mucho tiempo (Kohen Avramoglu et al, 2006; Alvarez, 2006). Sin embargo, en los últimos años han surgido serios cuestionamientos al valor que se les puede atribuir a los biomarcadores clásicos como evaluadores de riesgo, evolución clínica, o eficacia terapéutica (Peters, 2008; Gómez et al, 2009; Khera et al, 2011, Ruiz y Morosini 2011).

### **1.5.- La DM2 y las apolipoproteínas como biomarcadores de evolución clínica**

La apolipoproteína CIII (Apo-CIII) es la apolipoproteína más abundante en las partículas VLDL y presenta una estrecha correlación con las concentraciones de triglicéridos totales y de VLDL en suero (Marcoux et al, 2001). La Apo-CIII modula el metabolismo de los TAG en dos etapas (Van Dijk et al, 2004). En primer lugar, es un inhibidor de la LPL, y en segundo lugar interfiere en la fijación al receptor mediada por la apolipoproteína E, con lo cual retrasa la eliminación de las partículas residuales de VLDL. Una concentración elevada de Apo-CIII en las lipoproteínas Apo-B es un componente frecuente de la dislipidemia aterogénica, y ayuda a explicar el riesgo de ECV asociado a los triglicéridos elevados. Se ha especulado con la posibilidad de que la Apo-CIII pueda desempeñar un papel especial en cuanto al aumento del riesgo cardiovascular en los pacientes DM2, puesto que la resistencia a la insulina o el déficit de ésta en las personas diabéticas atenúan la regulación negativa de la expresión de Apo-CIII en el hígado. Además, el polimorfismo del elemento de respuesta a la insulina del promotor del gen de Apo-CIII influye en la correlación entre insulina y TAG (Dallogeville et al, 2001). Sin

embargo, hasta el momento son pocos los estudios realizados sobre las concentraciones de Apo-CIII en una población DM2, y los datos existentes son de larga data y no concluyentes (Venkatesan et al, 1995). Alaupovic et al (1992) observaron que la Apo-CIII estaba aumentada en las lipoproteínas Apo-B de los pacientes con DM2. Sin embargo, un análisis *post-hoc* más reciente derivado del ensayo CARE (Lee et al, 2003) ha demostrado que las personas diabéticas no presentaban concentraciones de Apo-CIII superiores a las de los no diabéticos con valores de TAG en ayunas similares. Así pues, según este metaanálisis, la DM2 no parece asociarse *de por sí* a concentraciones elevadas de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos con alto contenido de Apo-CIII. En la misma línea, un estudio de Hiukka et al (2005) ha descrito un déficit relativo de Apo-CIII en todas las especies moleculares de lipoproteínas ricas en triglicéridos en pacientes DM2, lo cual aporta una evidencia indicativa de que, a pesar del aumento de la concentración plasmática de Apo-CIII en estas personas, la concentración de esta apolipoproteína no aumenta *en paralelo* con los lípidos contenidos en las partículas que la contienen. Dado que la Apo-CIII desempeña un papel crucial en la eliminación hepática de los residuos de VLDL, esta falta relativa de Apo-CIII podría dar lugar a un deterioro en la eliminación de dichas partículas y a un tiempo de permanencia prolongado en la circulación, agravando con ello el riesgo de ECV.

Los polimorfismos de apolipoproteína E (Apo-E) pueden influir en las relaciones claramente establecidas de la hipertrigliceridemia con la hiperinsulinemia en los trastornos de resistencia a la insulina/hiperinsulinemia ligados a la condición DM2 (SiRIns). Desde hace muchos años ha quedado demostrado en mujeres que, a diferencia de las portadoras de Apo-E2 y Apo-E3 que muestran concentraciones plasmáticas de TAG más altas con hiperinsulinemia en ayunas, las premenopáusicas sanas con la isoforma apoE4 tienen altas concentraciones plasmáticas de TAG con bajos niveles de insulina en ayunas (Despres et al, 1993, 1998).

## **1.6.- La DM2 y las lipoproteínas que transportan el colesterol plasmático**

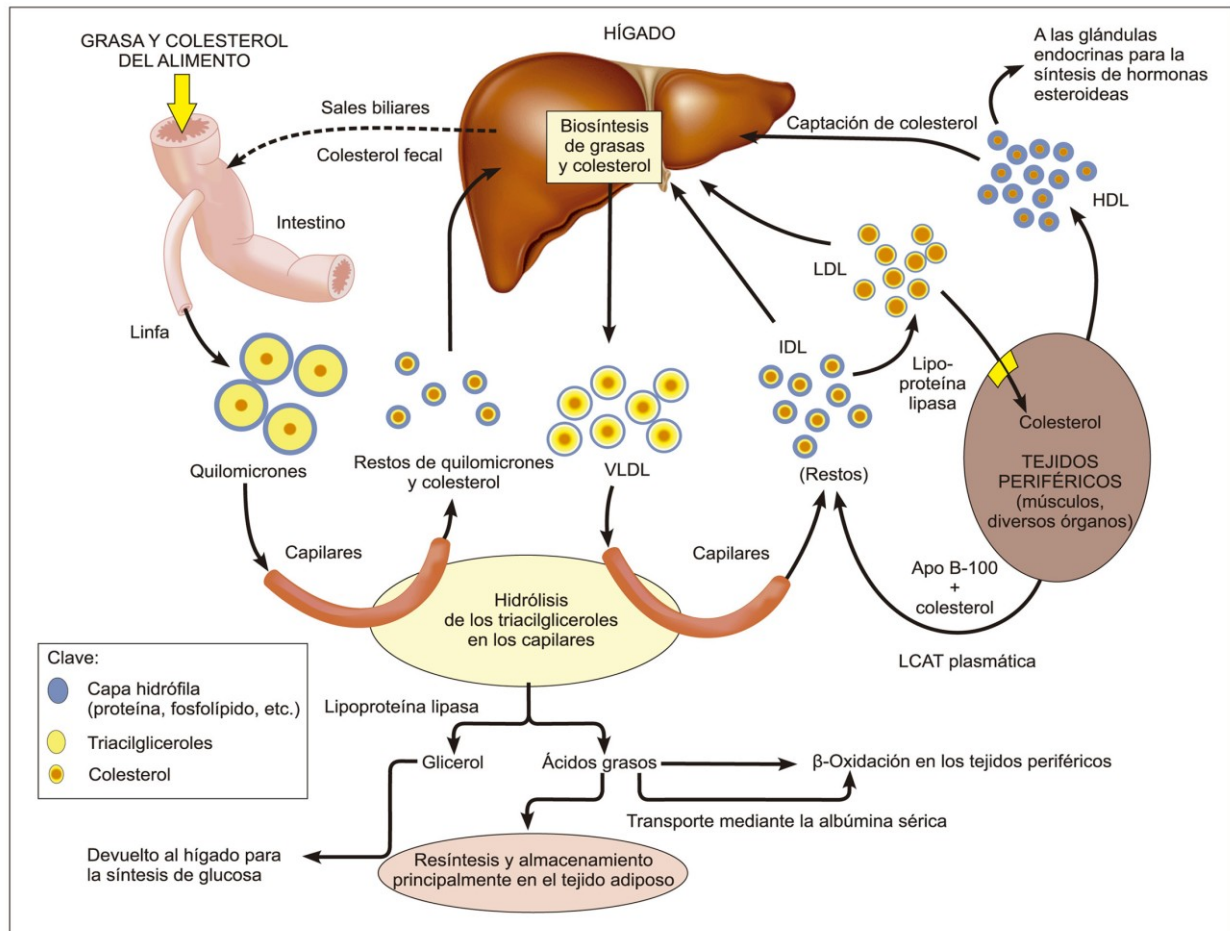
El metabolismo lipoproteico en humanos ha sido extensamente estudiado y continúa siéndolo a la luz de nuevas tecnologías que permiten afinar los aspectos más sutiles de estas rutas metabólicas. En la Fig. 4 aparece un esquema de sus aspectos más elementales. Los valores bajos de colesterol HDL, que son un factor

de riesgo de ECV bien conocido, constituyen otra característica destacada de la dislipidemia DM2 y se acompañan de una desviación hacia un tamaño de las partículas más pequeño y pro-aterogénico. El aumento de los TAG plasmáticos comporta un intercambio de lípidos centrales entre las partículas de densidades bajas e intermedias y las HDL. También se produce un aumento de la transferencia de colesterol esterificado facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (o LCAT), y de la transferencia de TAG a las partículas HDL, con lo que se produce un enriquecimiento de triglicéridos en estas últimas. Los TAG de las HDL son un sustrato adecuado para la lipasa hepática, y la hidrólisis produce partículas HDL más pequeñas y Apo-AI libre que son (eventualmente) excretadas por los riñones (Lamarche et al, 1999). El catabolismo de las HDL pequeñas es más rápido que el de las HDL normales, y ello da lugar a una reducción de la cantidad *total* de partículas HDL circulantes. Así pues, en la patogenia de la reducción de las HDL desempeñan un papel básico dos factores: el enriquecimiento de las HDL en los TAG y el aumento de la actividad de lipasa hepática, que da lugar a un incremento de la rapidez de eliminación de las partículas HDL y una reducción del nivel total de éstas en la sangre circulante.

Por su parte, el efecto protector de las HDL se atribuye principalmente a su papel en la *inversión* del transporte del colesterol o el así llamado *transporte reverso de colesterol* (periferia → hígado → ruta excretoria), pero es posible que intervengan también en ello otras propiedades de las HDL (anti-inflamatorias, antioxidantes, anti-trombóticas, etc.) (Taskinen, 2003; Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011).

Cabe decir entonces que las alteraciones de las HDL observadas en la dislipidemia DM2 (menor tamaño y concentraciones más bajas) contribuyen a producir el aumento de riesgo cardiovascular en estos pacientes.

**Fig. 4. Aspectos básicos del metabolismo lipoproteico en humanos**



Las partículas LDL pequeñas y densas (o del llamado *fenotipo B*) son una característica prominente de la dislipidemia DM2. El número de estas partículas aterogénicas se encuentra aumentado en estos pacientes pero la concentración de colesterol-LDL (LDL-C) continúa siendo normal o incluso inferior a lo normal. Así pues, en este contexto, la concentración absoluta de LDL-C puede ser un dato que lleve a engaño puesto que no refleja un aumento en el número de partículas *realmente* aterogénicas (Sniderman et al, 2001; Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011).

Se ha confirmado repetidas veces que la concentración de TAG plasmáticos es el factor determinante más importante del tamaño de las LDL (Rainwater, 2000). Por otra parte, el tamaño de las LDL disminuye de manera escalonada con la intolerancia a la glucosa y con el progreso clínico de la DM2, siendo el descenso mayor en las mujeres que en los varones (Gray et al, 1997; Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011). Los datos del grupo de Taskinen (2005) indican que los TAG de VLDL<sub>1</sub> son el principal predictor del tamaño de las LDL en los individuos con DM2, y

los experimentos de tipo cinético y metabólico señalan que las VLDL<sub>1</sub> son los precursores de las partículas de LDL más pequeñas y densas. De hecho, el largo tiempo de permanencia de las VLDL<sub>1</sub> en el plasma, debido a la reducción de la lipólisis, es un requisito previo para la formación de LDL pequeñas y densas puesto que se favorece el exceso de intercambio lipídico de TAG y ésteres de colesterol con LDL. Cuando las LDL han sufrido una depleción de ésteres de colesterol y un enriquecimiento en TAG, el aumento de la acción de la lipasa hepática da lugar a la formación de la subclase de partículas más aterogénicas. A partir de estos descubrimientos surge como obvio que la determinación de la sub-fracción LDL<sub>1</sub> sería un excelente biomarcador de riesgo aterogénico en los pacientes DM2. A pesar de que esto es cierto, desafortunadamente por ahora es una técnica que escapa al laboratorio de Bioquímica Clínica de mediana complejidad.

Dado que cada partícula de LDL contiene una molécula de Apo-B100, el número de LDL pequeñas y densas está aumentado y, de igual modo, la concentración de Apo-B100 aumenta en relación directa con ello. En consecuencia, las concentraciones de Apo-B100 son un biomarcador más sencillo de determinar mediante técnicas ahora accesibles (ELISA por ejemplo) del número de partículas aterogénicas y de la hipertrigliceridemia. La hiper-Apo-B100 es una característica bien conocida de la dislipidemia DM2 y otros estados de resistencia insulínica (Sniderman et al, 2001; Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011). En esta misma línea, la evidencia basada en estudios básicos, epidemiológicos y de ensayos clínicos, indica que la determinación de la Apo-B100 en plasma es un indicador fiable del riesgo cardiovascular y debería incluirse en todos los protocolos de atención sanitaria (Barter et al, 2005; Ruiz y Morosini, 2011).

Las partículas LDL modificadas, pequeñas y densas, son más aterogénicas por una serie de razones (Carmena et al, 2004). La mala unión al receptor de LDL favorece un tiempo de permanencia prolongado y esto, junto con el menor tamaño de la partícula, facilita su penetración o difusión en la íntima arterial (Chapman et al, 1998; Alvarez, 2006). Además, las LDL pequeñas y densas tienen una mayor afinidad de fijación que las partículas de mayor tamaño a los proteoglicanos de la íntima de la pared arterial, y son un objetivo fácil para las modificaciones pro-oxidativas (Chait y Wight, 2000; Ruiz y Morosini, 2011).

Las LDL del paciente DM2 se hallan continuamente expuestas a un ambiente pro-oxidativo con abundancia de especies radicalarias (ROS y RNS) agravado por un extenuado sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático. La

peroxidación de los lípidos de estas partículas provoca la acumulación de aldehídos y otros productos de la fractura de cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos (malondialdehído y varias otras sustancias reactivas al tiobarbiturato o TBARS). A su vez se oxidan y carbamilan los restos lisina de las cadenas laterales de los aminoácidos (con formación de los llamados carbonilos proteicos o PCs). Esta transformación es responsable de una respuesta inflamatoria local en el endotelio y de la activación de macrófagos (Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011). A su vez, el estado pro-inflamatorio gatilla la expresión de moléculas de adhesión como ICAM, VCAM, selectinas y quiotaxinas diversas descritas hace ya años (Khan et al, 1995) e intensamente aterogénicas. Para complicar este panorama, en la superficie de las LDL oxidadas (OX-LDL) aparecen nuevos epitopes que finalmente provocarán una respuesta autoinmune sobre todo en pacientes crónicos o mal controlados (Alvarez, 2006; González et al, 2007).

La lipoproteína “a” o Lp(a) tiene una estructura semejante a la LDL pero con una secuencia especial para su apolipoproteína (McLean et al, 2004) que se parece tridimensionalmente al plasminógeno. Por esta razón se cree que puede bloquear sus receptores e interferir por este mecanismo a la fibrinólisis (es decir funcionar como pro-trombogénica). Pero además, su reducido tamaño la hace muy difusible en el endotelio y tiene la facultad de unirse con alta afinidad a los proteoglicanos de la pared vascular (Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011). Se la considera un factor de riesgo aterogénico *independiente* (del mismo tipo que la homocisteína por ejemplo) aunque no se han hecho extensos estudios del nivel de Lp(a) en los pacientes DM2 hasta la fecha (Ruiz y Morosini, 2011). Esto constituye una importante cuestión aún pendiente en relación al pronóstico a largo plazo de esta patología.

En resumen, la dislipidemia diabética es una agrupación compleja y aún no del todo esclarecida de anomalías lipídicas que están estrechamente relacionadas entre sí desde el punto de vista metabólico. Es característica la hipertrigliceridemia, debida en su mayor parte a una producción excesiva de partículas VLDL<sub>1</sub>, el HDL-C bajo, el predominio de la subclase de partículas LDL pequeñas y densas, y la lipemia postprandial prolongada, resaltando el importante papel que desempeña la resistencia a la insulina. Los componentes aterogénicos más potentes de la dislipidemia DM2 son las LDL pequeñas y densas, la elevación de las partículas residuales de TAG y las HDL bajas y enriquecidas en la sub-clase HDL<sub>3b/3c</sub> (Barter, 2005; Alvarez, 2006). La coexistencia de estos tres factores agrava

significativamente la acumulación de lípidos en la pared arterial y la formación de placas ateroscleróticas.

### 1.7.- La disfunción endotelial en la DM2: biomarcadores *emergentes*

Un creciente número de investigadores en todo el mundo apunta a dilucidar el valor clínico potencial de una familia de marcadores denominados *emergentes* y se ha visto con optimismo que los que podrían ser potencialmente más útiles son los destinados a evaluar la disfunción endotelial que caracteriza a la DM2 o DiEnDi (disfunción endotelial asociada a diabetes mellitus de tipo II).

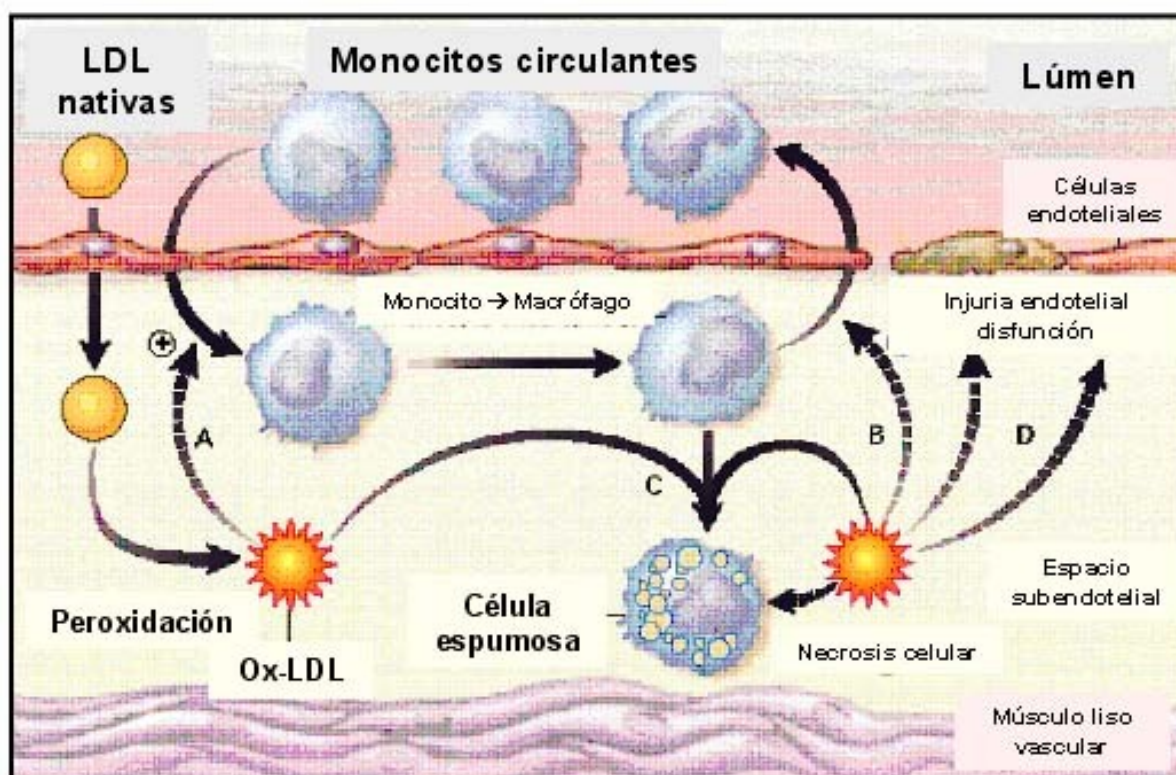
La disfunción endotelial es difícil de definir, pero en general se acepta internacionalmente que se caracteriza por un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas producidas por el endotelio vascular que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad de la pared arterial, facilitando el desarrollo de la placa ateromatosa, la agregación plaquetaria y el subsecuente tromboembolismo (Badimón y Martínez-González, 2006). El aspecto más sobresaliente y también más antiguo de la DiEnDi apunta al desbalance entre los factores constrictores de la pared vascular (endotelinas, endoperóxidos, angiotensina II, varias especies radicalarias del oxígeno y del nitrógeno, etc.) y los vasodilatadores (óxido nítrico, factor hiperpolarizante derivado del endotelio, prostaciclina, etc.). Este concepto rudimentario ha ido luego evolucionando hasta la visión actual que plantea al endotelio como un órgano endócrino y autócrino-paracrino muy complejo y con una variedad de funciones vinculadas a la proliferación celular y a la quimiotaxis. Además de la vasoconstricción, la dislipemia inducida (local y sistémica), la inflamación y el estado pro-agregante/trombogénico constituyen los factores de *disfuncionalidad* endotelial que finalmente conducen hacia la aterogénesis.

Desde hace ya una década ha quedado establecido que la DiEnDi es la manifestación más temprana (subclínica y subsignológica en sus comienzos) de la patología vascular que acompaña a la DM2 (Badimón y Martínez-González, 2006) y que se inicia con la pérdida - en sus comienzos silente - de la capacidad del endotelio para controlar el tráfico de macromoléculas hacia el interior de la pared y favorecer el depósito preferencial de fibrinógeno y LDL. La activación del endotelio como respuesta a este *infiltrado* a su vez provoca la expresión exagerada y la



secreción de varias citoquinas como la interleukinas-1 y -6, factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) o de fibroblastos (bFGF), factores quimiotácticos como el derivado de monocitos (MCP-1), y la exposición de proteínas de superficie con capacidad adherente (CAM) que actúan como ligandos de receptores linfocitarios específicos. Estos últimos se agrupan en dos grandes familias, las selectinas (como la E y la P) y las inmunosimilinas, como las moléculas de adhesión intercelular 1, 2 y 3 (ICAM-1, -2, -3) o de adhesión vascular (VCAM-1, como la mas importante de todas). La VCAM-1 se ha reportado consistentemente elevada en pacientes con hipertrigliceridemia, enfermedad aterosclerótica periférica o cerebral y DM2 (Badimón y Martínez-González, 2006). En la Fig. 5 se esquematiza la parte más conceptual del conocido proceso de formación de la placa ateromatosa que se sustenta sobre los hechos antes mencionados.

**Fig. 5. Secuencia de los eventos esenciales generadores de la placa ateromatosa**

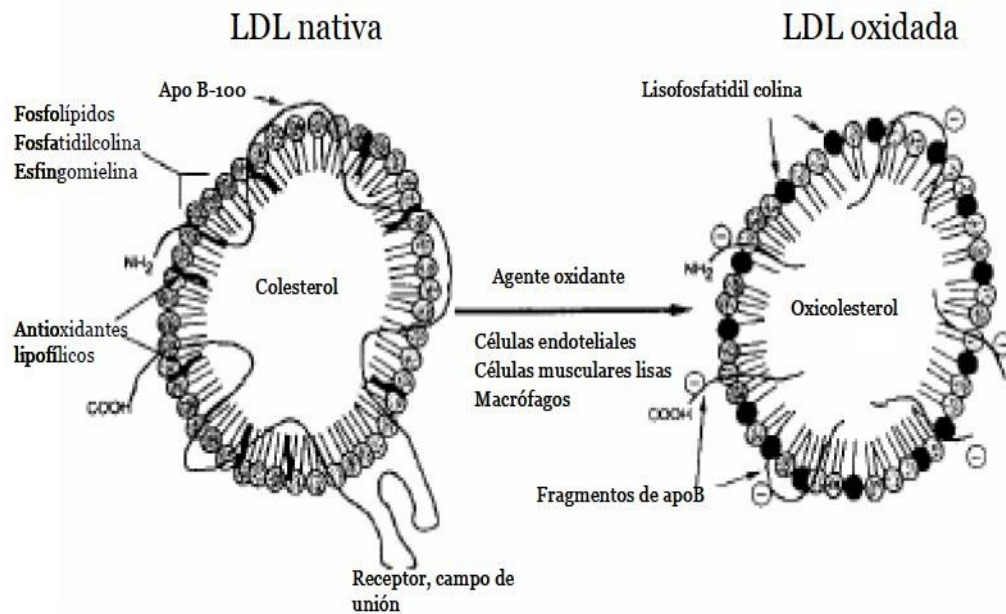


La importancia relevante que posee el estrés oxidativo durante el proceso de formación de las denominadas “células espumosas” (fagocitos enriquecidos en vacuolas de lípidos, principalmente colesterol esterificado) que son parte esencial de la placa ateromatosa se muestra en la Fig. 6. Se esquematizan allí los cambios

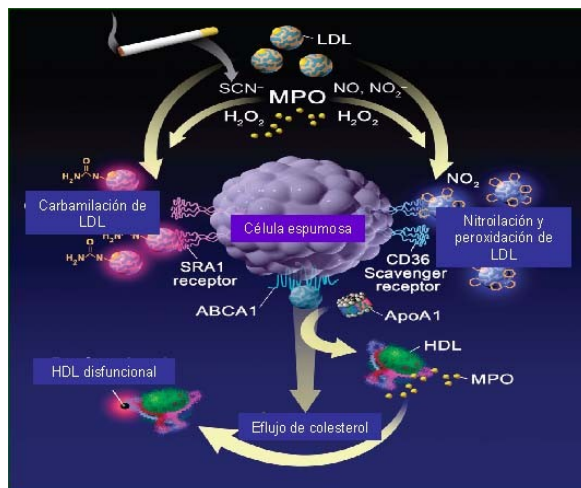
salientes en las LDL oxidadas (A), los factores que llevan a la peroxidación de esta lipoproteína (B), y el aspecto histológico de una placa ateromatosa dentro del lumen arterial (C). Nótese que la peroxidación lipídica genera lisoderivados de fosfolípidos y fragmentación de cadenas proteicas y/o carbamitación de restos de aminoácidos (formación de carbonilos proteicos).

**Fig. 6. (A) La peroxidación de la LDL conlleva la degradación de fosfolípidos con la aparición de lisoderivados y oxicolesterol; (B) el tabaquismo y el estrés oxidativo de causa múltiple producen peroxidación de LDL, formación de células espumosas, y finalmente generan HDL no funcionales con falla en el transporte reverso de colesterol; (C) aspecto histológico de una placa ateromatosa arterial teñida por el método tricrómico.**

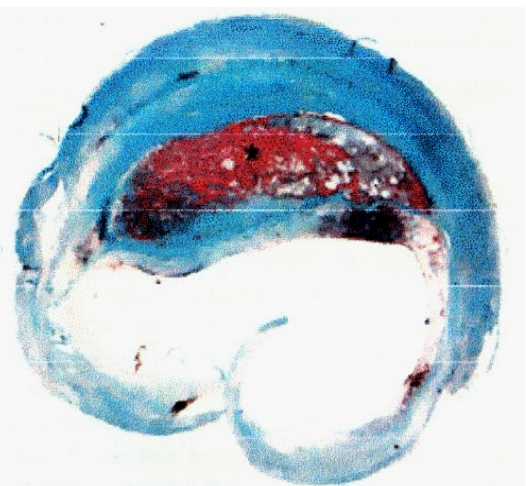
(A)



(B)



(C)



La disminución de la vasodilatación dependiente de óxido nítrico (NO) constituye el signo más temprano de la DiEnDi (Clapp et al, 2004; Naseem, 2005) lo cual es atribuible a la infiltración por LDL y por su forma oxidada (Ox-LDL). Esta forma peroxidada se acumula captada por los receptores *scavengers* y “carroñeros” del tipo CD36 y CRA en relación directa con el estrés oxidativo repetidamente demostrado en los pacientes con DM2 (Rains y Jain, 2011). Es esta condición pro-oxidativa la que muchos investigadores asocian directamente como factor causativo en la etiopatogénesis de la DiEnDi (Chowiencyk et al, 2000; Sprague y Khalil, 2009) caracterizada por sobreproducción de productos de glicosilación avanzada (AOPP) y acumulación de productos de glicosilación final (o AGEs) (Thomas, 2011), además de incremento característico de los marcadores de inflamación en circulación periférica tales como la proteína C-reactiva (PCR) y la ceruloplasmina (CRP) (Glorian y Limon, 2007; Chakraborty et al, 2011).

El NO es el factor vasodilatador más potente que produce el endotelio en condiciones normales (Herrera et al, 2010) y la declinación de su disponibilidad (no necesariamente de su biosíntesis, que de hecho puede estar incrementada) es el evento considerado crítico en la disfunción endotelial (Imrie et al, 2010). Sin embargo, los endotelocitos también generan otras moléculas vasoactivas tales como el factor activador de plaquetas (PAF) y la endotelina-1 (ET-1), siendo esta última de suma importancia por ser el vasoconstrictor más poderoso conocido hasta ahora de origen natural (Ouviña et al, 2004) y con indiscutible interés clínico (Badimón y Martínez-González, 2006; Glorian y Limon, 2007).

Finalmente comentaremos que la DiEnDi se caracteriza por la hipersecreción de moléculas de adhesión plaquetarias como el factor von Willebrand (vWF), fibronectina, trombopostina, y factores V (Leiden) y I (fibrinógeno). El fibrinógeno ha sido asociado a las complicaciones microvasculares de los diabéticos aún en los casos clínicamente considerados estables o compensados (Duc Son et al, 2008; Muniyappa et al, 2008). En estadios más avanzados de la DiEnDi la alteración mecánica asociada al disturbio del flujo laminar fisiológico, activa la sobre-expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y del factor de transcripción nuclear kappa-beta (NF- $\kappa$ B) que agravan el estado pro-inflamatorio y pro-agregante de manera sinérgica al regular la sobre-expresión de genes controladores de IL-1, IL-6, COX-2, ICAM-1, VCAM-1 y la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Badimón y Martínez-González, 2006; Muniyappa et al, 2008; Duc Son et al, 2008) cuyos efectos

deletéreos podrían ser (eventualmente) neutralizados por la adiponectina (AN) (Maia-Fernandes et al, 2008).

Un estudio realizado hace tiempo sobre 46 placas ateromatosas de pacientes DM2 comparadas con otras tantas de pacientes no diabéticos, demostró que las placas de los pacientes DM2 eran mucho más ricas en señales inflamatorias, especialmente infiltración por linfocitos T, macrófagos, actividad del sistema ubiquitin-proteosómico 20S (asociado a aumento de NF- $\kappa$ B, FNT- $\alpha$ , y acumulación de nitrotirosinas, peroxinitrito y superóxido) (Alvarez, 2006). Asimismo estas placas eran más pobres en colágeno lo que indica que eran del tipo denominado *vulnerable* o *inestable* (y por consiguiente mucho más proclives a ruptura y a subsecuentes eventos tromboembólicos).

Por añadidura a lo antes dicho, los pacientes con DM2 presentan alteraciones importantes de la composición (cantidad y calidad) de ácidos grasos (FAs) en todos sus tejidos. Esto es una consecuencia esperable de las complicadas y profundas modificaciones del metabolismo lipoproteico (ya mencionadas), de las modificaciones en la expresión de genes (a nivel transcripcional y post-transcripcional) provocadas por la falla en la actividad biológica de la insulina, y por el catabolismo alterado de todos los lípidos que incluyen el proceso de captación tisular y utilización mitocondrial de los ácidos grasos para su  $\beta$ -oxidación. Por otro lado, enzimas claves de la biosíntesis de ácidos grasos esenciales generados por etapas alternativas de elongación-desaturación oxidativa a partir de sus precursores -el linoleico (18:2 n-6) para la serie n-6 y al  $\alpha$ -linolénico ( $\alpha$ -18:3 n-3) para la serie n-3- están también alteradas por las características metabólicas especiales del paciente DM2 (probablemente con inhibición de la actividad de las  $\Delta$ 5 y  $\Delta$ 6 desaturasas microsomales de FAs tal como se observa en animales diabéticos y/u obesos) (Rimoldi et al, 2001; Montanaro et al, 2003; Brenner et al, 2003; Brenner, 2003; Montanaro et al, 2007).

Desde hace tiempo se sabe fehacientemente que las membranas de eritrocitos periféricos son un excelente recurso para estudiar el promedio de composición de FAs en los últimos tres meses de la vida en humanos (Tynan et al, 1995; Vidgren et al, 1997; Marra et al, 1998; Niranjan y Krishnakantha, 2000; Mazzucco, 2010). Sin embargo, y a pesar de que los métodos de análisis de composición de FAs se han ido haciendo cada vez más accesibles para laboratorios de mediana complejidad, este análisis no se constituyó aún en un recurso evaluativo del progreso clínico de la DM2, ni en forma general, ni aún como biomarcador en

pacientes selectos por su especial cuadro clínico. No debemos olvidar que la composición de FAs de lípidos de membrana correlaciona con el balance pro-/anti-inflamatorio y agregante, pues los derivados de la serie n-3 son reconocidos como poderosos anti-trombóticos, anti-inflamatorios, y depresores del nivel circulante de TAG (Buckley et al, 2005; Putadechakum et al, 2005; Wendland et al, 2006; Lee et al, 2006; Mattar y Obeid, 2009; Kalogeropoulos et al, 2010; Mas et al, 2012; Rangel-Huerta et al, 2012; Steffen et al, 2012) - especialmente en pacientes con DM2 (Goh et al, 1997; Sirtori y Galli, 2002) - en contraposición con los efectos provocados por los homólogos de la serie esencial n-6 (Schmitz y Ecker, 2008).

## Hipótesis experimental

---

*"Nunca pienses que ya lo sabes todo.  
Por muy alto que te valores,  
ten siempre a mano la posibilidad de cambiar de opinión,  
el coraje constructivo de llamarte ignorante,  
y la placentera sensación de interrogarte  
para aventurarte en algo nuevo".  
- Ivan Pavlov -*

## 2.- Hipótesis experimental

De acuerdo con el estado actual del tema se desprende que los pacientes con DM2 presentan alteraciones del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos, proteínas, y muy especialmente cambios en la competencia endotelial que los predisponen a un mayor riesgo para padecer ECV (enfermedad cardiovascular). Estos factores predisponentes serían modificables mediante intervención farmacológica apropiada.

Por consiguiente, se contrastarán variables obtenidas mediante análisis de laboratorio de muestras de sangre periférica (muestreo mínimamente invasivo) en pacientes DM2 bajo diferentes estrategias terapéuticas tendientes a desafiar la siguiente hipótesis experimental:

*Los pacientes diabéticos de tipo 2 que se hallan bajo tratamiento con insulina presentarían una menor disfunción endotelial y un estado significativamente más protectoro frente al riesgo aterogénico que los que se mantienen con protocolos que emplean hipoglucemiantes orales, independientemente de la eficiencia con que se controlen los parámetros convencionales referidos al metabolismo de los hidratos de carbono.*

Esta hipótesis experimental descansa en la siguiente hipótesis operacional, que en realidad es la alternativa de la hipótesis nula:

*El estado pro-trombótico y de disfunción endotelial en los pacientes DM2 se pueden evaluar mediante biomarcadores específicos y estarían determinados por los niveles elevados de ET-1, vWF, alteraciones cuali-cuantitativas en la composición de ácidos grasos de membranas eritrocitarias y niveles de apolipoproteínas y NOx asociados a la dislipemia y al estado de insulino-resistencia. Estos biomarcadores se verían mejorados por la administración de insulina pero no así por la de hipoglucemiantes orales como única elección farmacoterapéutica.*

## Objetivos generales y específicos

---

*"Algunos nos critican porque investigamos células y bichitos que no sirven para nada. Pero nada es aplicable a lo desconocido, por consiguiente lo primero es conocer".*  
*- Luis Federico Leloir -*



### 3.- Objetivos generales y específicos

En esta Tesis trabajamos con un grupo de personas control que hemos designado con la letra “C”, y con un grupo de pacientes diabéticos de tipo 2 divididos en dos subgrupos: “HO” (tratados con hipoglucemiantes orales exclusivamente) y “HO+I” (tratados con hipoglucemiantes orales con insulinización).

Considerando lo antes dicho en la parte introductoria, y teniendo en cuenta que a pesar de la gran cantidad de evidencia experimental y epidemiológica que señala la utilidad de los mencionados biomarcadores emergentes en la práctica clínica estos no suelen ser empleados en forma sistemática, es que nos hemos propuesto investigar los siguientes cinco objetivos específicos que enunciamos en forma de desafíos de la hipótesis experimental:

- (i) varios biomarcadores de disfunción endotelial son significativamente diferentes entre diabéticos tipo 2 tratados con dos esquemas farmacológicos actualmente empleados (hipoglucemiantes orales o hipoglucemiantes orales con insulino terapia combinada),
- (ii) existe una correlación entre los valores de algunos de estos biomarcadores y el tiempo de evolución del cuadro clínico para ambos subgrupos,
- (iii) se observa una correlación entre pares de biomarcadores ajustados previamente por el tiempo de evolución clínica,
- (iv) hay una dependencia de los cambios con el tipo de insulina agregada a los esquemas de hipoglucemiantes orales, y
- (v) en comparación con los resultados de un grupo control pareado por edad y sexo, y de los grupos tratados entre si, se pueden emplear estos biomarcadores como justificativo para indicar uno u otro tipo de esquema farmacológico como el más conveniente para el paciente DM2.

## Materiales y métodos

---

*"Ya sea en la búsqueda intelectual de la ciencia,  
o en esa otra mística del espíritu,  
la luz de la verdad nos hace una seña para que nos acerquemos,  
y el propósito que surge de nuestra naturaleza  
responde diseñando una estrategia".*

*- Sir Arthur Eddington -*

## 4.- Materiales y métodos

### 4.1- Selección de controles y pacientes

Las poblaciones de pacientes y controles se reclutaron durante los años 2009 y 2010 a partir de los consultorios externos de instituciones públicas y privadas del gran La Plata siguiendo un criterio de inclusión/exclusión en el cual se contempló la mayor cantidad de variables confusionales (Irala et al, 2001).

Fueron *criterios de inclusión* padecer de DM2 con o sin síndrome metabólico, con una evolución mínima de tres años desde el diagnóstico confirmado, pertenecer al área del Gran La Plata, ser mayor de edad pero menor de 80 años, encontrarse bajo un tratamiento farmacológico estable de al menos un año de duración que se halle dentro de los esquemas pautados para este estudio (ver mas adelante), seguir estrictamente las indicaciones dietarias e higiénico-sanitarias establecidas como estándares del experimento, y tener un ayuno de 12 horas previo a la extracción de las muestras de sangre.

Se consideraron *criterios de exclusión* enfermedades degenerativas osteoarticulares, patologías auto-inmunes de cualquier tipo (en especial lupus eritematoso o colagenopatías de origen diverso), neoplasias o displasias en curso (se admitieron solo aquellos casos en los cuales se había superado una enfermedad sin recidiva en los últimos 10 años), infecciones agudas o crónicas fúngicas, virales o bacterianas en curso (sífilis, HIV, dengue, fiebre amarilla, hepatitis virales de cualquier tipo, tuberculosis, micosis sistémicas de cualquier etiología tales como criptococosis, aspergillosis, etc., infección herpética diseminada, glomerulonefritis recidivantes, etc.), infestaciones de cualquier etiología estén o no en curso (Chagas, leishmaniasis, paludismo, toxoplasmosis, filariasis, histoplasmosis), asma y pacientes hiperérgicos sintomatológicos, enfermedades neurodegenerativas en cualquier estado evolutivo, enfisemáticos, pacientes con mucoviscidosis, pacientes con dislipemias congénitas manifestadas durante la infancia, insuficientes hepáticos, desnutridos, receptores de transplantes de cualquier tejido u órgano sin importar el tipo de implante, cardiópatas congénitos, varones con varicocele, varones con adenocarcinoma prostático, pacientes en el período post-quirúrgico de cualquier intervención, pacientes con endocrinopatías de cualquier etiología (con o sin tratamiento) distintas a la disfunción propia de la DM2, deportistas de elite o profesionales de cualquier rama del deporte, pacientes que reciben tratamiento fibrinolítico por cualquier causa, mujeres con enfermedad poliquística de mama u

ovario o dismenorreicas crónicas, pacientes convalecientes de trauma físico de cualquier tipo, pacientes edematosos o febriles sin diagnóstico cierto, personas clínicamente sanas que consumen preparaciones magistrales de cualquier tipo tales como tisanas, formulaciones vitamínicas, oligoelementos, suplementos antioxidantes, y formulados a base de ácidos grasos puros o en mezclas, esteroides de tipo anabólico o anti-inflamatorios esteroides o no esteroides administrados en forma crónica, personas que siguen dietas extremas (vegetarianos, macrobióticos, etc.), alcohólicos o adictos a cualquier droga incluso las denominadas menores (cannabis, por ejemplo), gestantes en cualquier semana y post-parto hasta los 8 meses del alumbramiento.

Además de cuidar la homogeneidad para las indicaciones higiénico-sanitarias (alimentación, ejercicio) se llevó un exhaustivo registro de toda la medicación complementaria recibida por todos los grupos estudiados a los fines de la cruzada estadística de datos (ver "Anexo").

Los pacientes se sub-clasificaron en dos categorías: insulinizados (con o sin medicación hipoglucemiente agregada) y nunca insulinizados bajo tratamiento exclusivamente a base de hipoglucemiantes orales. Un tercer grupo lo constituyó el de los controles considerados clínicamente sanos. Todos los participantes (un total de 104; 38 controles y 66 diabéticos) firmaron un consentimiento informado antes de ingresar en el estudio (ver "Anexo"). La deserción y/o exclusión de los reclutados fue nula durante la prosecución del estudio.

#### **4.2- Toma de muestras**

Luego del examen clínico-semiológico exhaustivo y del interrogatorio que contempla la recogida de datos demográficos y variables categóricas, todos los integrantes se sometieron a una extracción de sangre venosa mediante material descartable estéril y apirogénico tras 12 horas de ayuno. La sangre (aprox. 15 mL) se dispensó en un tubo plástico graduado con tapa a rosca de bioseguridad (Falcon Co. CA, USA) conteniendo conservantes apropiados (en concentraciones finales: buffer 50 mM fosfato sódico pH: 7,40 heparinizado a 2 UI/mL, o 10 mM EDTA disódico, y 10 mM butil-hidroxitolueno o BHT, según correspondiera a cada tipo de determinación). Durante la colección las muestras se mantuvieron a 4 °C y se las encriptó con un código para preservar el anonimato del paciente. Luego de la

centrifugación por 20 min a 1500 g se obtuvo el plasma que se crionizó a -80 °C bajo nitrógeno hasta que fue analizado.

#### 4.3.- Obtención de fantasmas eritrocitarios y leucocitos

Una parte de cada muestra se procesó para la obtención de leucocitos y fantasmas eritrocitarios. El paquete eritrocitario se trató para la obtención de fantasmas (*ghosts*) de acuerdo con la técnica de (Berlin et al, 1989) modificada en nuestro laboratorio (Marra et al, 1998). En síntesis, se usaron dos buffers. Buffer A: KCl 5 mM, NaCl 140 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, TRIS 10 mM y glucosa 5 mM (pH 7,40) y buffer B: EDTA 0.25 M en TRIS 10 mM (pH 7,40). Se centrifugaron las muestras de sangre 10 min a 1000 g en rotor Sorvall SS-34 a 4 °C. Luego de separar el plasma sobrenadante se aspiró la capa superior del pellet (*buffy coat*) rica en leucocitos para ser procesada como se indicará luego. El pellet se lavó 4 veces con buffer A a razón de 10 veces su volumen. Luego se provocó la hemólisis agregando 40 volúmenes de buffer B, mezclando por inversión e incubando a 4 °C por 15 minutos. Se centrifugó 15 min a 10.000 x g y el pellet se lavó con el buffer B respetando los volúmenes y tiempos del paso anterior. El pellet así obtenido quedó formado por fantasmas que lucieron blancos o ligeramente rosados debido a la hemoglobina (Hb) estructural (fuertemente unida a la cara interna de la membrana plasmática). Para incrementar el desprendimiento de Hb se los congeló a -15 °C y descongeló dos veces y luego se volvieron a lavar 2 veces con buffer B. La obtención de los leucocitos de sangre periférica se realizó de acuerdo con la técnica descrita en el equipo comercial de Sigma Chem. Co. *Leukocyte Isolation Kit* (CA, USA). En síntesis la capa enriquecida en leucocitos se sembró en un gradiente de Phycoll formado con 9.56 g de Ficoll en 20 ml de yodamina y 13 mL de agua destilada. Luego se centrifugó a 1500 g por 20 min y las bandas enriquecidas en leucocitos se aspiraron con pipetas Pasteur para ser lavadas extensamente con PBS frío (20 volúmenes, tres lavados a 800 g por 10 min cada vez). Cada pellet de fantasmas y leucocitos se alicuotó en microtubos Eppendorf y se conservaron hasta su análisis junto con las alícuotas de plasma en un ultrafreezer Bioforma (USA) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a -70 °C.

## **4.4- Determinaciones y metodologías empleadas**

### **4.4.1.- Óxido nítrico [NOx]**

Se empleó la metodología de Verdon et al (1995). Si bien el método no es muy reciente y fue reemplazado por otros posteriores debido a su costo y relativa dificultad, se lo prefirió por seguir considerándolo como referente a nivel internacional. Se empleó la reacción de Griess que valora la totalidad de los aniones (nitratos + nitritos) resultantes de la dismutación del óxido nítrico bajo la forma de nitritos totales y por esa razón al resultado se lo simboliza [NOx] aunque se lo exprese como nitritos totales (usualmente en concentración micromolar o referidos al tenor proteico de la muestra). Los resultados obtenidos por la técnica de Verdon et al en aprox. el 35 % de las muestras se compararon con los obtenidos por la metodología de Miranda et al (Miranda et al, 2011) que recurre a una etapa de desproteinización previa con metanol/cloroformo en lecho de hielo seguida de un reducción con  $VCl_3$  antes de practicar la reacción de Griess. Los datos obtenidos fueron estadísticamente indistinguibles entre ambos procedimientos.

### **4.4.2.- Carbonilos proteicos (CP)**

La técnica empleada detecta la formación de grupos “oxo” o carbonilos por oxidación de restos laterales de las cadenas de aminoácidos debida al ataque por sustancias reactivas del oxígeno (ROS). Este biomarcador estima el daño oxidativo a proteínas y aminoácidos libres en forma sensible y confiable (Berlett y Stadtman, 1997; Chevion et al, 2000; Komosinska-Vassev et al, 2012), especialmente en los pacientes DM2 (Martín-Galland, et al, 2003; Margetis et al, 2009, Bhooshan Pandey et al, 2010). La reacción se basa en la formación de difenilhidrazonas que forman un cromógeno detectable espectrofotométricamente a 366 nm (UV) y para el cálculo se emplea el coeficiente de extinción molar de las hidrazonas alifáticas que es  $22.0 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (Reznick y Packer, 1994).

### **4.4.3.- Sustancias reactivas al tiobarbiturato (TBARS)**

El método detecta fundamentalmente malondialdehído (MDA) generado por fractura de la cadena de ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) debido al ataque de los ROS. De modo que este biomarcador profusamente utilizado en todo el mundo está destinado a evaluar la tasa de lipoperoxidación lipídica. Se utilizó la metodología fluorimétrica de Yagi (1976) que es superior a otras debido a su altísima sensibilidad (100 veces más que la equivalente técnica colorimétrica en el visible) y a que tiene una etapa de precipitación de proteínas y co-precipitación de lípidos. El sobrenadante se elimina y se realiza la fluorimetría en el precipitado redissuelto con lo que se evita la interferencia con otras sustancias reactivas al tiobarbiturato (presentes en la muestra) y no atribuibles a la lipoperoxidación. Como precaución adicional, la etapa de calentamiento para la formación del aducto se realizó en presencia de butil-hidroxitolueno (BHT) 5 mM como cortador de cadena que evite la formación de nuevos lipoperóxidos inducidos por calor que no estuvieran presentes en la muestra original. Es por lo tanto equiparable a las determinaciones de MDA hechas por HPLC que son considerablemente más trabajosas y mucho más costosas, y para algunos, menos reproducibles que esta metodología espectrofluorimétrica.

#### **4.4.4.- Ceruloplasmina (CRP)**

El método empleado está descrito en detalle en el trabajo de Cerón y Martínez-Subiela (2004). En síntesis, las muestras se analizaron por medio de la conversión catalítica de la p-fenilenediamina en un cromógeno de color púrpura que se cuantificó midiendo su densidad óptica en un Multi-Detector Microplate Reader SpectraMax M2/m2<sup>o</sup> model (Molecular Devices Analytical Technologies; Sunnyvale, CA, USA). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 8.3 y 4.4 %, respectivamente. Una determinación piloto de la concentración de ceruloplasmina (CRP) en el plasma de 36 voluntarios sanos fue de  $30.7 \pm 5.0$  mg/dl la cual resultó muy similar a la previamente reportada para humanos (Prakasam et al, 2001).

#### **4.4.5.- Evaluación de la capacidad antioxidante total plasmática (Ensayo FRAP)**

Se empleó la técnica de Benzie y Strain (1996). A pH ácido se determinó la habilidad del plasma para reducir iones férricos a ferrosos. La generación de Fe (II) a partir de Fe (III) se cuantificó colorimétricamente por formación de un complejo con tripiridil-triacina [Fe<sup>II</sup>- TPZ] que exhibe un intenso color azul con un pico de absorción en el visible a 583 nm. Se trata de una reacción no específica que cuantifica todos los componentes que tienen capacidad reductiva (bilirrubina, ácido úrico, vitámeros, etc.). La formación del complejo sigue una cinética lineal durante los primeros minutos de la reacción, por lo que se efectuó un registro continuo de la absorbancia en rangos cortos de medida (hasta 3 min) y se obtuvo la pendiente de la curva al origen. Este valor fue luego normalizado o comparado con una solución de Fe (II) standard y con Trolox (diacetato de  $\alpha$ -tocoferilo) como reductor de referencia. Las variaciones en el contenido plasmático de hierro no tuvieron incidencia en el resultado del test. Para darle mayor correlación con el contenido de antioxidantes minoritarios en nuestro ensayo se destruyó el ácido úrico por pretratamiento con exceso de uricasa (Sigma Chem. Co.; Bs. As, Argentina) tratando cada muestra de plasma a temperatura ambiente con 10 UI de enzima/mL durante 20 min en suave agitación.

#### **4.4.6.- Proteínas totales**

Utilizamos el método de Bradford (1976) que resulta ser rápido, sensible, lineal y muy simple de llevar a cabo. De alta reproducibilidad y color final estable por una hora (con solo un 4 % de decrecimiento de la D.O) es apropiado para muestras con alto contenido proteico como las analizadas en este estudio. Se basa en el cambio de absorbancia que experimenta el colorante Brilliant Coomassie Blue G-250 (BCB-G250) al ligar proteínas. El máximo de absorbancia ocurre a 595 nm.

#### **4.4.7.- Biomarcadores específicos**

La insulina (Ins) se midió empleando el kit comercial AutoDELFIA de Perkin Elmer & Anal. Sci. Inc. (Massachussets, USA). El fibrinógeno (Fib) se determinó con el Human Fibrinogen ELISA Kit de Gen Way Biotech. Inc. (San Diego, USA). La medición de la endotelina-1 (ET-1) se efectuó con un equipo comercial de ELISA



(BioReaderXL, R&D System, Abingdon, UK). Se realizó primero la extracción de la ET-1 a partir de 1 mL de plasma con 1,5 mL de solvente de extracción [acetona: HCl 1N: agua (40:1:5)]. El extracto se centrifugó durante 20 min a 2500 g en una centrífuga refrigerada a 2 °C. Se decantaron los sobrenadantes en tubos Eppendorf de polipropileno y se llevaron a sequedad en un rotoevaporador a 37 °C (Savant RC-110, NY, USA). Los pellets reconstituidos en 0.25 mL del diluyente de muestra se ensayaron directamente mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (la concentración mínima detectable fue de 0.1 pg/mL). Las apolipoproteínas se determinaron mediante kits comerciales *ad-hoc*: Apo-B100 ELISA Kit (ALP) de Mabtech. Inc. (OH, USA), Apo-D se midió con el Human Apolipoprotein D ELISA Kit de MyBioSource (NY, USA) (ambas con un rango de detección de 3 a 30 mg/dL). La Apo-A1 se determinó con el SPQTM II Kit 86070 Liquid, de Dia Soria S.A. (Madrid España) de tipo nefelométrico. El tromboxano A1 se determinó como tromboxano B2 (TBX-B2) y su metabolito plasmático el 11-dehidroTBX-B2 usando el kit comercial TXB2 EIA Kit de Stressengen Bioreagents, Inc. Com., adquirido en Buenos Aires a la empresa TecnoLab S.A. Los niveles plasmáticos del factor von Willebrand (vWF) se midieron por ELISA (Asserachrom vWf, Diagnostica Stago, Asnières, Francia). La LDL-oxidada (Ox-LDL) se determinó mediante un ensayo ELISA sándwich con anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes antigénicos de la Apo-B modificados por estrés oxidativo y que se adquiere como [10007893-OxLDL- $\beta_2$ GPI] (Human) ELISA Kit a la empresa Cayman Chem. Co. (MI, USA). Los resultados se expresaron como el cociente Ox-LDL/LDL tal como lo recomienda Galland et al. (2006). La concentración plasmática de homocisteína se midió con el [IB46101-Homocysteine Assay Kit] de Immuno-Biological Laboratories, Inc. (IBL-Chicago, USA). El método utilizado para determinar adiponectina (AN) fue ELISA-Kit de Adiponectin Biovendor Laboratory Medicine, Inc. [RD195023100]. La hemoglobina glicosilada A1 (HbA1c) se determinó con la técnica de cromatografía de intercambio catiónico en microcolumnas de Sigma Chem. Co. (Buenos Aires, Argentina) y la fructosamina se midió con el Unimate FRA Assay Kit de Roche Diagnostics, Welwyn (Garden City, UK) corrigiéndose los datos de acuerdo a la proteinemia tal como lo sugieren Hartlan et al (2000). Los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) se determinaron fluorimétricamente en plasma utilizando la metodología descrita por Sampathkumar et al (2005).

#### **4.4.8.- Análisis de ácidos grasos en plasma, leucocitos y fantasmas eritrocitarios**

La composición de ácidos grasos de lípidos totales se estudió en plasma, leucocitos y membranas eritrocitarias de pacientes y controles. Luego de aisladas las muestras biológicas en la forma antes indicada, se extrajeron los lípidos por el método de Folch et al (1957). Seguidamente los residuos logrados luego de la partición y evaporación en atmósfera de nitrógeno se saponificaron con exceso de KOH en etanol a 80 °C por 40 min. Se realizó una extracción con hexano que se descartó para eliminar el insaponificable. El residuo se acidificó con exceso de HCl (c) y se re-extrajo con tres porciones de hexano de 3 mL c/u. Los extractivos reunidos se evaporaron a seco bajo corriente de nitrógeno o en un rotavapor de alto vacío a 30 °C (Speedvac Savant, CA, USA). El residuo de ácidos grasos se derivatizó a ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAGs) por tratamiento con exceso de trifluoruro de boro en metanol (al 10 % P/V) y calefacción en atmósfera inerte de nitrógeno a 75 °C por 2 horas siguiendo la técnica descrita por Morrison y Smith (1964). Finalmente se re-extrajeron los EMAGs y se analizaron mediante cromatografía gaseosa capilar computarizada (c-GLC) con detección de ionización de llama. Todos los EMAGs fueron identificados mediante sus tiempos de retención relativos al ácido palmítico (16:0) o al ácido araquidónico (20:4 n-6) empleando standards puros de procedencia comercial (Avanti Polar Lipids, NY, USA o Sigma Chem. CVo. Bs. As., AR). Las composiciones se expresaron en  $\mu$ moles/mg de proteínas y fueron cuantificados utilizando un standard interno de ácido eicosamonoenoico (20:1) agregado a cada muestra (1  $\mu$ g/tubo) antes de su procesamiento.

#### **4.4.9.- Otros parámetros de química clínica**

Se determinaron varios compuestos (ver "Anexo") presentes en sangre periférica y orina para explorar las funciones hepática, renal, el estado hematológico, y el lipidograma básico, empleándose kits comerciales de la firma Wiener Lab. (Rosario, Argentina). Las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

El riesgo cardiovascular poblacional se calculó usando el software de acceso público del laboratorio Pfizer, el cual puede consultarse en la URL siguiente: [[https://www.pfizer.es/salud/servicios/calculadoras/calculadora\\_riesgo\\_cardiovascular.html](https://www.pfizer.es/salud/servicios/calculadoras/calculadora_riesgo_cardiovascular.html)]. Este resultado se lo promedió con el estimador: [<https://www.hipocampo.org/riesgovascular.asp>] a un periodo de 10 años.

#### **4.5.- Aspectos bioéticos y legales**

El protocolo se consideró “no-invasivo” y se ajustó a la Declaración de Helsinki (<http://www.bioetica.uchile.cl/doc/helsinki.htm>) según el documento actualizado a partir de la primera declaración de la Asociación Médica Mundial, Declaración de Helsinki, Finlandia, 1964. Los aspectos legales estuvieron basados en el modelo descrito en <http://www.easp.es/legislacion/real+decreto+561+.htm>). El procedimiento estuvo en un todo de acuerdo con lo establecido por el Comité de ética del CONICET, en sus documentos regulatorios “*Lineamientos para el comportamiento ético del investigador*” (2005) y “*Lineamientos para el comportamiento en las ciencias biomédicas*” (2005), y con lo establecido por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en sus “*Guías operacionales para Comités de Ética que evalúan Investigación Biomédica*”, Ginebra (2000). Asimismo el estudio se sometió a evaluación independiente por el Honorable Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (COBIMED) que lo aprobó sin objeciones bajo el registro protocolar # 0800-002982-09/00.

#### **4.6.- Clasificación del estudio y análisis estadístico de los resultados**

Se trató de un estudio de tipo observacional retrospectivo, comparativo y transversal a doble ciego en donde los analistas y participantes no conocieron la clasificación de las muestras estudiadas hasta finalizar la investigación. Para disminuir el *error por sesgo* se estableció una pauta de inclusión/exclusión que contempló la mayor cantidad de factores confusionales (Irala et al, 2001) y en el criterio de selección se fijó un tamaño muestral mínimo de 33 integrantes por categoría calculado con la ayuda del software Epidat v 3.1 (<http://www.sergas.es>). Las variables fueron de dos tipos: cualitativas nominales y ordinales, y cuantitativas continuas que se sistematizaron mediante hojas de cálculo Excel (ver “Anexo”).

Cada paciente se analizó más de una vez (2-4 veces) con un máximo de una semana de distancia inter-análisis y los datos se promediaron antes de entrarlos en los estadísticos de prueba. Para la estadística descriptiva se expresaron los datos como media  $\pm$  desviación estándar ( $\xi \pm DS$ ) de los  $n$  que se indicarán en cada caso. Para la contrastación de  $H_0$  y  $H_1$  se tuvo en cuenta la naturaleza de la variable (escala de medición) y la potencia de la prueba. Las pruebas paramétricas y no paramétricas fueron precedidas de un test de normalidad de distribución de la variable según Kolmogorov-Smirnow. La prueba  $\chi^2$  se usó para comparación de medias de variables categóricas, mientras que el test t se usó para cuantitativas continuas. En algunos casos de vulneración de la normalidad se realizó una transformación logarítmica o se empleó la prueba de Mann-Withney. Para comparaciones múltiples se empleó análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey o bien se empleó ANOVA ponderado. Las regresiones y correlaciones (mínimos cuadrados, Spearman, Pearson, análisis multivariado; según correspondiera) y los ajustes lineales y no lineales de las curvas se efectuaron con la ayuda de los softwares Sigma Plot v12.0 y SPSS v17.0 (Illinois, USA). Agradecemos al Prof. Dr. Armando Cervantes Sandoval de la Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza, quien posee una Maestría en Cómputo Estadístico y es Doctor en Ciencias Biomatemáticas Especialista en Aplicación de Herramientas Cuantitativas y Computacionales a la Investigación; por habernos asesorado en el análisis de los resultados y haber efectuado la carga de datos en el programa SPSS de análisis bioestadístico. Excepto que se explicita otro valor, la significación establecida fue para  $p < 0.05$  en todos los casos que se consideren *significativamente diferentes*.

## Resultados

---

*"Lo opuesto de una formulación correcta  
es una formulación falsa.*

*Pero lo opuesto de una verdad profunda  
puede ser muy bien otra verdad profunda".*

*- Albert Einstein -*

## 5.- Resultados

### 5.1- Aspectos demográficos de la población estudiada y características generales de cada subgrupo

Tal como antes se mencionó, al grupo de personas controles se lo designó con la letra “C”, mientras que los subgrupos bajo los dos tipos de tratamiento farmacológicos que correspondieron a los pacientes DM2 los identificamos como “HO” (hipoglucemiantes orales exclusivamente) y “HO+I” (hipoglucemiantes orales con insulinización). En ambas poblaciones no hubo diferencias estadísticamente significativas en el promedio de los años de educación recibida, standard socioeconómico, estado marital (porcentaje de casados y/o viviendo con pareja estable) ni en el número de hijos concebidos por pareja (2 en promedio; datos no mostrados).

Para todos los subgrupos se hicieron las indicaciones higiénico-sanitarias recomendadas en los protocolos internacionales las cuales se extendieron cuando correspondía a los controles, especialmente las concernientes a los cuidados dietarios/nutricionales y la actividad física (tres caminatas semanales de 45 min. como mínimo).

No se registraron diferencias significativas en la mayoría de los aspectos encuestados (los ítems salientes incluyeron consumo de alcohol, tabaco, drogas analgésicas y/o antiinflamatorias de venta libre, consumo de suplementos nutricionales comerciales o no, empleo ocasional de psicofármacos tales como benzodiazepinas ansiolíticas, etc.) entre las poblaciones tratadas y los sujetos empleados como controles. Una encuesta nutricional retrospectiva basada en los lineamientos establecidos por el Ministerio de Salud de la Nación Argentina (ver “Anexo”) demostró diferencias significativas entre controles y pacientes atribuibles al menor consumo de hidratos de carbono y grasas saturadas que establecen los protocolos de tratamiento para DM2. Por esta razón en el análisis de regresión múltiple destinado a comparar grupos entre sí, se consideró a las calorías-día estimadas a partir de grasas saturadas e hidratos de carbono como distractor para la significación de las diferencias en cualquiera de los datos contrastados.

Otros valores relevantes -recopilados para las características demográficas y generales de los subgrupos estudiados- aparecen como información fraccionada en las Tablas 1, 2 y 3.

**Tabla 1. Características demográficas y generales para los subgrupos integrantes del estudio**

Parámetros	Grupo control y subgrupos tratados		
	C	DM2 (HO)	DM2 (HO+I)
Integrantes (n)	38	32	34
Total : 104	38		66
Sexo (numero sobre el total ; %)			
Femenino	16/38 ; 42.1	14/32 ; 43.8	15/34 ; 44.1
Masculino	22/38 ; 57.8	18/32 ; 56.2	19/34 ; 55.9
Edad (años)			
Mujeres	62.5 ± 5.1	60.6 ± 9.2	64.8 ± 4.9
Hombres	58.3 ± 6.4	55.8 ± 6.0	61.3 ± 8.0
Promedio total	60.6 ± 6.9	57.6 ± 8.1	62.2 ± 7.7
Peso (kg)			
Mujeres	65.2 ± 5.1a	80.2 ± 4.4b	70.3 ± 3.8c
Hombres	79.8 ± 7.3a	88.0 ± 9.5b	80.6 ± 6.1a
Promedio total	73.7 ± 8.5a	85.9 ± 10.2b	76.5 ± 5.7a
Altura (m,cm)			
Mujeres	1.66 ± 0.28	1.68 ± 0.21	1.64 ± 0.25
Hombres	1.72 ± 0.20	1.72 ± 0.15	1.74 ± 0.17
Promedio total	1.67 ± 0.22	1.69 ± 0.31	1.71 ± 0.26

*(Ver clave para la interpretación a continuación de la tabla 3)*

**Tabla 2. Características demográficas y generales para los subgrupos integrantes del estudio (continuación)**

Parámetros	Grupo control y subgrupos tratados		
	C	DM2 (HO)	DM2 (HO+I)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )			
Mujeres	23.6 ± 3.3a	28.4 ± 5.0b	26.1 ± 3.8b
Hombres	27.0 ± 4.0	29.7 ± 3.7	26.6 ± 4.2
Promedio total	26.4 ± 4.5a	30.1 ± 4.9b	26.2 ± 4.0a
Clase IMC <sup>1</sup> (% totales dentro de cada subgrupo)			
Infrapeso	0	0	0
Bajo peso (BP)	0	0	0
Peso normal (PN)	33.3a	14.6b	28.5a
Sobrepeso (SP)	57.6	60.3	57.3
Obesidad premórbida (OPM)	9.1a	25.1b	14.2c
Obesidad mórbida (OM)	0	0	0
Diámetro abdominal (cm)			
Mujeres	85.0 ± 7.2a	98.3 ± 10.5b	90.5 ± 11.3a
Hombres	98.6 ± 6.3	105.2 ± 17.0	98.5 ± 10.6
Promedio total	91.8 ± 7.1	100.2 ± 16.2	94.3 ± 10.7
Diámetro de cadera (cm)			
Mujeres	78.1 ± 5.1a	98.8 ± 7.6b	93.4 ± 5.2a
Hombres	83.6 ± 4.5	91.5 ± 12.2	90.7 ± 6.6
Promedio total	80.4 ± 4.9a	95.0 ± 8.3b	92.2 ± 6.3b
Abdomen/Cadera			
Mujeres	1.09 ± 0.15	0.99 ± 0.12	0.96 ± 0.08
Hombres	1.18 ± 0.09a	1.15 ± 0.14a	1.08 ± 0.10b
Promedio total	1.14 ± 0.14	1.05 ± 0.14	1.02 ± 0.10

*(Ver clave para la interpretación a continuación de la tabla 3)*



**Tabla 3. Características demográficas y generales para los subgrupos integrantes del estudio (continuación)**

Parámetros	Grupo control y subgrupos tratados		
	C	DM2 (HO)	DM2 (HO+I)
Raza <sup>2</sup> (% totales dentro de cada subgrupo)			
Negro (N)	0	0	0
Afro-Americano (AA)	0	0	0
Blanco-caucásico (BC)	2.6	0	0
Blanco-Hispano (H)	86.9	83.4	85.8
Mestizo-Indígena (MI)	10.5	16.6	14.2
Asiático (AS)	0	0	0
Fumadores <sup>3</sup> (% totales dentro de subgrupo)			
NO (*)	55.3 (21/38)	63.7 (20/32)	59.1 (20/34)
SI	44.7	36.3	40.9
≤ 12 cigarrillos/día (contribución al porcentaje positivo)	17.6	16.6	18.5
> 12 cigarrillos/día (contribución al porcentaje positivo)	27.1	19.7	22.2
Consumo de alcohol (% totales dentro de cada subgrupo) <sup>4</sup>			
No consume (NO) (*)	23.6 (9/38)	21.8 (7/32)	26.4 (9/34)
Bebedores ocasionales/sociales (BO)	68.4	71.8	67.6
Bebedores por encima de la media (EM)	8.0	6.4	6.0
Alcohólicos (A)	0	0	0
Presión arterial (mm Hg) <sup>6</sup>			
Sistólica	128.0 ± 7.1	139.8 ± 6.3	135.3 ± 8.1
Diastólica	69.4 ± 5.0	75.1 ± 5.0	73.2 ± 4.5
Síndrome metabólico (% dentro de cada subgrupo) <sup>5</sup>			
Mujeres	0	63.6	55.5
Hombres	0	59.0	50.0

Diferentes letras al final de cada variable indican diferencias significativas para ese valor entre los subgrupos (prueba  $\chi^2$ , test *t*, ANOVA + Tukey-test, bi- o multivariado, según correspondiera como se indicó en la parte de metodologías).<sup>1</sup> La clasificación del IMC no se discriminó por sexos por simplicidad (los valores no fueron estadísticamente significativos entre hombres y mujeres, con aparente incremento en las mujeres aunque con mayor dispersión en torno a la media lo cual anuló la significación estadística) y se rigió de acuerdo con los siguientes valores:

infrapeso (IP < 16), bajo peso (17 < BP < 20), peso normal (20 < PN < 25), sobrepeso (26 < SP < 30), obesidad premórbida (31 < OPM < 39) o mórbida (OM > 40).<sup>2</sup> N: negro; AA: afro-americano; BC: blanco caucásico; H: Hispano; MI: mestizo/indígena; AS: asiático.<sup>3</sup> Porcentaje de fumadores expresado en términos de “NO” fumador; o fumadores que consumen menos o igual a 12 cigarrillos/días o mas de esa cantidad. (\*) Entre paréntesis el número sobre el total dentro de cada subgrupo.<sup>4</sup> En porcentaje del total dentro de cada población. “NO” corresponde a no bebedor. BO: Bebedor ocasional/social; EM: por encima de la media; A: alcohólico. (\*) Entre paréntesis figura el número sobre el total dentro de cada subgrupo. Se tomaron como parámetros de referencia los datos oficiales de la OMS: carga metabólica máxima de 35 gramos/día para varones adultos de 70 Kg (aprox. 280 mL de vino) y 25 gamos/día para mujeres (aprox. 200 mL).<sup>5</sup> Porcentaje de pacientes que cumplen criterios para ser incluidos en síndrome metabólico según la OMS: hipeglucemia/hipertension/dislipemia/sobrepeso/hipertensión/resistencia insulínica/hiperinsulinemia.<sup>6</sup> Sin diferencias entre las mujeres y los varones integrantes de cada subgrupo.

El consumo de tabaco y alcohol, así también como la composición racial de los subgrupos no fue significativamente diferente. Sin embargo, en algunos parámetros se registraron diferencias que merecen ser comentadas.

El peso corporal entre mujeres u hombres de los tres grupos fue mas alto para los tratados que para los controles y más alto aún para HO que para HO+I. Fue también diferente la distribución en categorías por exceso de peso siendo mayor el IMC en las mujeres DM2 que en las controles y con un predominio de obesidad premórbida en las DM2 bajo tratamiento HO (diferente a C y a HO+I) (no mostrado). Las mujeres del grupo HO también tuvieron mayor diámetro abdominal y de cadera con respecto a C y a HO+I; sin embargo, esto no significó cambios sustanciales en la relación abdomen/cadera que si resultó menor en los hombres tratados con HO+I.

Los detalles de la implementación de las dos categorías de tratamiento aparecen en la Tabla 4 y obedecen a posologías e indicaciones en su mayoría coincidentes con protocolos farmacoterapéuticos internacionales.

**Tabla 4. Tratamientos farmacológicos dentro de cada subgrupo (en porcentajes de pacientes que los reciben)**

Drogas y posologías	Subgrupos	
	HO	HO + I
Glibenclamida (10 mg/día V.O.)	7.6	--
Metformina (1700 mg/día V.O.)	46.2	--
Idem + glimepirida (2 mg/día V.O.)	15.4	--
Idem + glibenclamida (10 mg/día V.O.)	30.8	--
Idem + Insulina NPH (entre 30 y 74 U/día V.S.C.)	--	9.0
Idem + Insulina Regular (entre 6 y 42 U/día V.S.C.) asociada a NPH	--	54.5
Idem + Regular asociada a NPH (entre 30 y 74 U/día V.S.C.)	--	27.2
Idem + NPH asociada a insulina Lispro (6 U/día)	--	9.3

Se puede ver que casi el 50 % de los pacientes de cada subgrupo recibió metformina como representante mayoritario dentro de la categoría HO o bien insulina *Regular* asociada a *NPH* dentro de la categoría HO+I. Luego, aprox. 30 % de los pacientes se encuentra dentro del esquema asociado metformina + glibenclamida o insulina *Regular* y metformina (respectivamente). En principio, se analizarán los datos en conjunto para HO y para HO+I independientemente de las asociaciones entre drogas, para luego analizarlos teniendo en cuenta esta cuestión.

Como una variable importante a tener en cuenta en el estudio estadístico, se investigaron las posibles diferencias entre la duración total del tiempo de tratamiento entre subgrupos sin que se encontraran diferencias significativas ni en este parámetro ni en el tiempo acaecido desde el diagnóstico (Tabla 5).

**Tabla 5. Duración de los esquemas terapéuticos para los grupos DM2**

Parámetros	Subgrupos	
	HO (n = 32)	HO+I (n = 34)
Tiempo desde el diagnóstico de DM2	7.0 ± 2.9	9.3 ± 3.1
Años de tratamiento total (con uno o mas esquemas)	7.0 ± 2.9	8.8 ± 4.0
Valores extremos años de tratamiento (dentro del subgrupo)	3 – 10	5 - 14
Años de tratamiento con el correspondiente esquema	6.5 ± 3.1	5.1 ± 2.2

*Todos los datos son promedios ± DS.*

Asimismo se tuvieron en cuenta los tratamientos farmacológicos concomitantes con la patología de base, muchos de los cuales se implementaron

como consecuencia de la evolución clínica del propio cuadro de DM2 (complicaciones crónicas), o por otras causas para el grupo control. Estos datos aparecen detallados en la Tabla 6.

**Tabla 6. Tratamientos farmacológicos concomitantes**

Droga	Grupo control y subgrupos tratados		
	C (n = 38)	HO (n = 32)	HO+I (n = 34)
Enalapril	39.4	37.5	35.2
Acido acetilsalicílico	13.1	25.0	23.5
Gemfibrozil	0	8.8	10.0
Amilodipina	0	3.4	4.4
Omeprazol	13.2	15.6	14.7
Atorvastatín	0	2.2	0
Rosuvastatina	0	1.7	0
Finasteride	0	1.7	2.5
Nimodipina	0	2.2	0
Hidroclorotiazida	0	1.7	0
Salmeterol + fluticasona	0	1.7	0
Cilostazol	0	3.4	2.2
Atenolol	0	1.7	2.2
Fluoxetina	0	3.0	3.2
Complejo B	2.6	6.2	5.8
Losartán	0	1.7	0

*Datos expresados como porcentajes de pacientes (o controles) dentro de cada subgrupo que recibieron tratamientos farmacológicos concomitantes.*

Para concluir con la parte descriptiva de las personas integrantes del estudio, se resumen en la Tabla 7 los eventos sobresalientes de sus historias clínicas.

**Tabla 7. Datos sobresalientes de las historias clínicas (en porcentajes de incidencia dentro de cada subgrupo)**

Evento	Grupo control y subgrupos		
	C (n = 38)	HO (n = 32)	HO+I (n = 34)
Riesgo aterogénico > 4	0	55.2	42.1
Arteriopatía/arterioesclerosis periférica difusa	0	12.0	5.2
Neuropatía periférica	0	4.0	1.5
Retinopatía diabética	0	3.5	1.5
Disfunción eréctil	2.0	2.6	0
Stent por coronariopatía	0	4.0	1.0
Accidente cerebrovascular	0	2.0	0
Amputación supracondílea miembro inferior	0	1.0	0
Nefropatía	0	4.5	1.0
Angor recurrente	0	8.0	3.0

## 5.2- Bioquímica clínica

Seguidamente se muestran los datos de química clínica basal para los controles y subgrupos estudiados considerados en su conjunto (hombres y mujeres) (Tabla 8). A los fines de simplificar la presentación de los datos, las diferencias entre sexos se comentarán luego separadamente, como así también las posibles diferencias dentro de cada sub-grupo para los distintos tipos de tratamientos en el caso de los pacientes DM2.

La mayoría de los resultados no presentó sesgo por el sexo con excepción de los valores de gamma-glutamiltanspeptidasa ( $\gamma$ -GT) que fueron ligeramente mas altos en los hombres que en las mujeres mostrando un incremento de orden fisiológico (sin significación clínica pues se lo atribuye a la mayor masa muscular estriada) y una tendencia estadísticamente no significativa a una mayor trigliciridemia en las mujeres.

En cambio, se halló que la glucemia en ayunas fue mas alta para los DM2 respecto a C, pero con diferencias entre los subgrupos HO y HO+I (menor en este último subgrupo). La glucemia postprandial fue más alta para el subgrupo HO

mientras que la Hb A1c fue similar para ambos DM2 y más alta que la observada para el grupo C.

El colesterol total no mostró diferencias entre grupos, pero los pacientes DM2 del sub-grupo HO tuvieron menor HDL-colesterol que los otros subgrupos lo mismo que valores menores para la trigliciridemia y mayores para la proteinuria. Por otro lado, los valores de depuración de creatinina endógena en los pacientes DM2 fueron menores que los observados en el grupo C.

En general, los DM2 tratados con cualquiera de los esquemas del tipo HO+I mostraron mejores valores de química clínica básica en cuanto al metabolismo de la glucosa y del colesterol transportado por HDL y aparentemente un mejor desempeño renal en comparación con los HO. El análisis multivariado demostró que dentro del subgrupo HO+I no se observaron diferencias significativas *discriminantes* entre los subtipos de combinaciones de drogas empleadas, lo que sugiere una independencia de las significaciones halladas respecto del tipo de insulina empleada en el tratamiento.

### **5.3- Marcadores del metabolismo glucídico**

Los datos concernientes específicamente al metabolismo glucídico aparecen en la Tabla 9. Se puede ver claramente que los pacientes DM2 presentaron elevada glucemia y fructosamina con valores diferenciales para HO vs HO+I, elevada insulinemia (con importante dispersión de datos dentro de cada sub-población), mayores cocientes glucemia/insulinemia e índice HOMA (asociados a SiRIns) y un descenso significativo en los niveles de adiponectina para ambos subgrupos DM2. Los valores de glucemia postprandial y de hemoglobina glicosilada (Hb A1c) mostrados en la Tabla 9 conciben con los anteriormente informados para este grupo de datos.

**Tabla 8. Resultados de análisis de química-clínica básica en los subgrupos experimentales**

Parámetros	Grupo control y subgrupos tratados			Parámetros	Grupo control y subgrupos tratados		
	C (n = 38)	HO (n = 32)	HO+I (n = 34)		C (n = 38)	HO (n = 32)	HO+I (n = 34)
Glucemia en ayunas (g/L)	0.89 ± 0.12a	1.72 ± 0.63b	1.33 ± 0.25c	TGP (U/l)	20.7 ± 5.5	24.7 ± 12.0	22.5 ± 9.9
Glucemia post-prandial (g/L)*	1.41 ± 0.32a	2.30 ± 0.79b	1.52 ± 0.66a	TGO (U/L)	17.8 ± 6.1	19.4 ± 8.3	18.2 ± 7.3
Hb A1c (%)	4.0 ± 0.15a	7.60 ± 2.2b	6.0 ± 2.1b	Bilirrubina conjugada (mg/L)	4.3 ± 2.0	5.6 ± 1.3	6.6 ± 2.1
Uremia (g/L)	0.35 ± 0.12	0.44 ± 0.18	0.38 ± 0.22	Fosfatasa alcalina (U/L)	210.3 ± 6.9	194.2 ± 3.3	201.0 ± 7.5
Creatininemia (mg/L)	8.84 ± 1.3	9.20 ± 2.5	8.55 ± 1.9	γ-GT (U/L)**	25.8 ± 8.7	30.9 ± 17.0	27.8 ± 10.6
Ac. úrico (mg/L)	42.2 ± 7.5	50.9 ± 16.4	44.6 ± 11.4	Proteinemia (g/dL)	7.12 ± 0.44	6.89 ± 0.61	7.01 ± 0.57
Colesterol total (mg/dL)	185.3 ± 22.1	219.7 ± 55.1	205.5 ± 21.0	Hemograma			
HDL-Colesterol (mg/dL)	49.3 ± 4.2a	38.3 ± 3.0b	45.6 ± 4.2a	Hemoglobina (g/dL)	14.0 ± 1.8	13.1 ± 1.2	13.7 ± 0.9
LDL-Colesterol (mg/dL)	126.5 ± 15.2a	144.1 ± 17.2b	149.1 ± 11.3b	Eritrocitos (.10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4.37 ± 0.74	4.27 ± 0.52	4.36 ± 0.60
TAG (mg/dL)	102.7 ± 18.6a	175.6 ± 27.3b	195.2 ± 16.5c	Leucocitos (miles/mm <sup>3</sup> )	6.9 ± 1.8	7.0 ± 1.7	6.6 ± 0.8
Proteinuria (mg/L)	9.5 ± 2.3a	44.4 ± 5.5b	18.1 ± 6.0c	Linfocitos (%)	30.4 ± 4.7	30.9 ± 8.1	28.5 ± 5.0
Clearance de creatinina (mL/min)	132.0 ± 11.2a	102.2 ± 17.7b	121.6 ± 10.3c	Neutrófilos (%)	64.6 ± 5.3	65.3 ± 7.5	66.9 ± 8.2
Albuminemia (g/dL)	4.09 ± 0.20	3.78 ± 0.41	4.02 ± 0.35	Eritrosedimentación (mm/1ra.h)	9.2 ± 4.6	18.7 ± 11.0	11.4 ± 8.7

*Todos los datos en promedios ± DS. \*; 2 horas post-carga; \*\*, con diferencias significativas entre hombres y mujeres. Las letras diferentes junto a cada resultado indican diferencias significativas entre subgrupos para p < 0.05 o menor.*

Se puede acotar que la mayor dispersión alrededor de la media para los datos de insulinemia (y por consiguiente del HOMA) se podría deber a las variaciones propias de cada esquema farmacológico, las diferentes vidas medias de las insulinas empleadas, y/o a la desigual distribución para la incidencia de SiRIns dentro de los subgrupos HO y HO+I. La situación temporal del paciente dentro del cuadro evolutivo es otro importante factor pro-dispersivo pues la resistencia periférica (y la hipersecreción subsecuente de insulina como mecanismo compensatorio) tiende a incrementarse con los años de enfermedad. Un estudio de correlación (no mostrado) comprueba que efectivamente en nuestros pacientes se cumple esta consideración ampliamente conocida para los pacientes DM2 desde hace años.

Si se discriminan los pacientes con y sin SiRIns, las conclusiones obtenidas siguen siendo equivalentes a las enunciadas y se mejora ostensiblemente la dispersión de los datos respecto de su medida central. Quizás lo más notable para mencionar sea que la adiponectina (AN) es mucho mas baja en pacientes obesos (con elevado IMC) y en aquellos con pronunciado síndrome de resistencia insulínica respecto de los restantes, independientemente del sub-grupo al cual pertenezcan (ver análisis de correlación mas adelante).

**Tabla 9. Biomarcadores del metabolismo glucídico y de SiRIns**

Parámetros	Grupo control y subgrupos tratados		
	C (n = 38)	HO (n = 32)	HO+I (n= 34)
Glucemia (mmol/L)	4.94 ± 0.42a	8.44 ± 0.66b	6.38 ± 0.74c
Insulina (μUI/mL)*	5.9 ± 1.9a	18.8 ± 9.1b	24.6 ± 10.3c
Glucemia/Insulinemia	0.84 ± 0.11a	0.44 ± 0.06b	0.26 ± 0.07c
HOMA	1.29 ± 0.31a	7.05 ± 0.87b	6.97 ± 0.51b
Adiponectina (mg/dL)	13.7 ± 1.5a	5.6 ± 0.7b	8.8 ± 0.6c
Fructosamina (μmol/L)	184 ± 11a	248 ± 145b	203 ± 17c

*Todos los datos son promedios ± DS. Las letras diferentes junto a cada resultado indican diferencias significativas entre subgrupos para  $p < 0.05$  o menor. HOMA, calculado como  $[glucosa (mmol/L) \cdot Insulina (\mu UI/mL)]/22.5$ . (\*) Se consideró al total de los datos de cada sub-grupo, sin discriminar por IMC o síndrome metabólico (ver mas adelante).*



### 5.3- Biomarcadores no convencionales o emergentes

Seguidamente se muestran (Tabla 10) algunos biomarcadores no convencionales o emergentes determinados en plasma con el objeto de ponderar el impacto del estrés oxidativo y nitrativo (o nitrosativo) en controles y pacientes DM2.

**Tabla 10. Estado redox y biomarcadores de daño pro-oxidativo en plasma**

Biomarcadores	Grupo control y subgrupos tratados		
	C (n= 38)	HO (n= 32)	HO + I (n= 34)
Carbonilos proteicos (PCs) (nmoles/mg.prot.)	0.41 ± 0.06a	1.55 ± 0.11b	1.23 ± 0.04c
TBARS (µM)	0.82 ± 0.10a	3.42 ± 0.23b	2.91 ± 0.30c
Ensayo FRAP (µM, en unidades Trolox®)	1235 ± 76a	884 ± 101b	947 ± 73b
Vitamina E (µM, como α-tocoferol)	27.2 ± 1.5a	21.1 ± 1.3b	25.6 ± 1.0a
Glutatión reducido (GSH) (µM)	795 ± 46a	626 ± 85b	649 ± 71b
Glutatión oxidado (GSSG) (µM)	187 ± 23a	303 ± 46b	221 ± 54c
GSH/GSSG	4.25 ± 0.22a	2.07 ± 0.12b	2.94 ± 0.06c
AGEs (AU/mg prot.)	3.1 ± 0.1a	6.8 ± 0.3b	4.4 ± 0.2c

*Todos los datos son promedios ± DS. Las letras diferentes junto a cada resultado indican diferencias significativas entre subgrupos para  $p < 0.05$  o menor. Los "n" coinciden con los ya mencionados en las tablas previas.*

Resulta interesante comprobar, mediante la determinación de estos biomarcadores en sangre periférica, el extenso daño pro-oxidativo que acompaña al cuadro de DM2 aún considerado (por algunos) "compensado" desde una mirada tradicional debido al consulo de antioxidantes lipo- e hidro-solubles que caracteriza a los pacientes DM2. En realidad tal compensación no existe en terminos reales, de lo contrario, el sistema de defensa antioxidante (tanto enzimático como no enzimático) impedirían hallar las elevaciones de los marcadores de daño (PCs, TBARs) que se observan en los resultados de este estudio.

Todos los indicadores de estrés oxidativo - y de daño asociado a estrés oxidativo/nitrosativo - resultaron muy alterados y en la mayoría de los casos existió una diferencia significativa entre los dos tipos de tratamientos. Comprobamos que siempre fue mas favorable la condición en la cual se suplementó a los hipoglucemiantes orales con insulina de algún tipo, sin que se hallaran diferencias

dentro de los sub-esquemas farmacológicos empleados para el grupo de pacientes DM2.

El cuadro clínico estuvo acompañado de mayor carbonilación proteica, descenso del glutatión reducido e incremento concomitante del oxidado (con la consiguiente disminución del cociente (GSH/GSSG), mayor consumo de vitamina E, y mayor acumulación de productos avanzados de glicosilación (AGEs). Por su parte el ensayo FRAP, asociado al estado redox promedial, indicó una clara disminución *generalizada* de antioxidantes lipo- e hidro-solubles en la sangre de los pacientes DM2. A pesar de obtenerse un valor algo menor en pacientes DM2 con tratamiento HO vs HO+I, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa entre ambos tipos de esquemas farmacológicos (quizás si resultara serlo en una muestra de mayor *n*).

Los marcadores convencionales para riesgo aterogénico en pacientes DM2, algunos de los cuales ya se han mostrado en la Tabla 8, se incluyen ahora acompañados de otros marcadores emergentes en la Tabla 11. De los resultados mostrados en esta tabla se desprende claramente que toda la población DM2 - independientemente de su tipo de tratamiento farmacológico - presentó elevación significativa de muchos de los indicadores de riesgo aterogénico/cardiovascular, y que además varios de ellos tuvieron diferencias significativas entre pacientes tratados con HO y con HO+I. Esto condice con estimadores groseros del riesgo proyectado a 10 años de evolución.

**Tabla 11. Biomarcadores del metabolismo lipídico y riesgo aterogénico**

Parámetros	Grupo control y subgrupos tratados		
	C (n = 38)	HO (n = 32)	HO+I (n = 32)
Colesterol total (mg/dL)	185.3 ± 22.1a	219.7 ± 55.1a	215.5 ± 21.0a
HDL-colesterol (mg/dL)	49.3 ± 4.2a	38.3 ± 3.0b	45.6 ± 4.2a
LDL-colesterol (mg/dL)	126.5 ± 15.2a	144.1 ± 17.2b	149.1 ± 10.3b
TAG (mg/dL)	102.7 ± 18.6a	175.6 ± 27.3b	195.2 ± 16.5c
LDL-oxidada (mU/L)	46.5 ± 3.3a	83.3 ± 5.5b	62.1 ± 4.2c
Ox-LDL/LDL	0.37 ± 0.05a	0.58 ± 0.03b	0.42 ± 0.03c
Lipoproteína(a) (mg/dL)	12.2 ± 1.5a	25.3 ± 2.1b	16.4 ± 1.0c
TAG/HDL-C	2.08 ± 0.11a	4.58 ± 0.12b	4.30 ± 0.07c
CT/HDL-C	3.75 ± 0.14a	5.77 ± 0.21b	4.72 ± 0.15c
LDL-C/HDL-C	2.56 ± 0.22a	3.76 ± 0.13b	3.27 ± 0.08c
Riesgo promedio de la población (%)*	8 ± 3a	25 ± 4b	16 ± 5c
Homocisteína (µmoles/L)	5.7 ± 0.8a	16.6 ± 1.3b	11.1 ± 1.0c
<b>Apolipoproteínas</b>			
Apo-D (mg/dL)	22.5 ± 1.1a	17.4 ± 0.8b	25.1 ± 1.1c
Apo-B100 (mg/dL)	77.0 ± 8.2a	112.4 ± 3.5b	115.5 ± 6.2b
Apo-A1 (mg/dL)	142.2 ± 15.5a	155.2 ± 11.1a	159.4 ± 14.3b
Apo-B100/Apo-A1	0.54 ± 0.04a	0.72 ± 0.05b	0.72 ± 0.11a
LDL-C/Apo-B100	1.64 ± 0.05a	1.28 ± 0.14b	1.29 ± 0.11b
Apo-B100/Apo-D	3.42 ± 0.33a	6.46 ± 0.51b	4.60 ± 0.49c

*Todos los datos son promedios ± DS. Las letras diferentes junto a cada resultado indican diferencias significativas entre subgrupos para  $p < 0.05$  o menor. ( \*) Calculado como promedio del riesgo a 10 años proyectado por los estimadores descriptos en la parte experimental.*

En este sentido resultaron especialmente interesantes las diferencias encontradas entre los valores de Ox-LDL, cociente Ox-LDL/LDL, Lp(a), homocisteína, Apo-D (la cual correlaciona con el nivel de HDL colesterol) y de las relaciones entre Apo-B100/Apo-A1 y Apo-B100/Apo-D que mostraron significaciones en función del esquema farmacológico implementado. Sin embargo, todas estas diferencias no se encontraron asociadas al tipo particular de insulina empleada en cada caso, pero si a la inclusión de alguna forma de la hormona en el protocolo farmacológico (análisis estadístico no mostrado).

Los niveles de Apo-B100 (VLDL, IDL y LDL) y Apo-A1 (quilomicrones) no fueron mejorados por la suplementación con insulina.

En la Tabla 12 se muestran varios biomarcadores de los denominados *emergentes* destinados a la evaluación del desempeño endotelial (DiEnDi), la inflamación, y el riesgo de tromboembolismo en todos los subgrupos investigados.

**Tabla 12. Biomarcadores de disfunción endotelial, agregación/adhesión e inflamación**

Parámetros	Grupo control y subgrupos tratados		
	C	HO	HO + I
Endotelina-1 (pg/mL)	1.12 ± 0.10a	4.19 ± 0.06b	3.10 ± 0.05c
Fibrinógeno (mg/dL)	278.8 ± 6.0a	377.5 ± 4.9b	366.2 ± 5.7b
IL-1β (pg/mL)	1.88 ± 0.22a	5.66 ± 0.15b	3.21 ± 0.11c
PCRus (mg/L)	1.15 ± 0.14a	2.55 ± 0.06b	2.12 ± 0.03c
FNT-α (pg/mL)	2.01 ± 0.14a	4.55 ± 0.22b	3.02 ± 0.15c
TBX-B2 (pg/μL)	61.7 ± 5.0a	93.6 ± 4.1b	75.3 ± 3.4c
Oxido nítrico como [NOx] (μM)	29.8 ± 2.6a	54.7 ± 2.9b	31.2 ± 1.8c
Factor vW (U/mL)	0.80 ± 0.10a	1.77 ± 0.07b	1.06 ± 0.08c
CRP (mg/dL)	30.2 ± 2.4a	45.7 ± 2.9b	39.4 ± 2.2c
VCAM-1 (ng/mL)	30.5 ± 3.0a	47.0 ± 1.1b	38.2 ± 1.7c

*Todos los datos son promedios ± DS. Las letras diferentes junto a cada resultado indican diferencias significativas entre subgrupos para  $p < 0.05$  o menor. Los n son los ya consignados en tablas anteriores.*

Lo importante de estos resultados es resaltar que no solo todos los biomarcadores estuvieron elevados en pacientes DM2 (tal como hubiera sido esperable) sino que además, hay una diferencia significativa entre los sub-grupos que tienen o no insulina como parte de la estrategia farmacológica. Para este grupo de resultados, nuevamente un análisis discriminado por el tipo de insulina empleada no demostró diferencias estadísticamente significativas asociables al tipo de insulina empleada según las condiciones descritas en la Tabla 4. Un análisis similar de múltiple correlación no asoció los resultados significativamente a ninguno de los tratamientos concomitantes descritos en la Tabla 7.

#### 5.4- Estudios de correlación y regresión entre biomarcadores emergentes

Realizamos también estudios de correlación entre variables seleccionadas (preferenciando las no tradicionales) para investigar en primer término si existía una correlación entre los valores de algunos de estos biomarcadores y el tiempo de evolución del cuadro clínico bajo tratamiento para ambos subgrupos; y en segundo lugar, si había una correlación demostrable entre *pares de biomarcadores ajustados o ponderados previamente* por el tiempo de evolución clínica u otros distractores.

Para acometer con el primer objetivo de esta parte del estudio de correlación se presentaron los resultados obtenidos para variables seleccionadas y la variable *tiempo de evolución clínica bajo tratamiento* (cuyos datos centrales y de dispersión se muestran en la Tabla 5) la cual se tomó como continua entre las cotas 3 y 14 años, discriminando entre sub-poblaciones HO y HO+I.

Se puede ver claramente (Tabla 13) que todas las variables destinadas a evaluar estrés oxidativo, disfunción endotelial, e inflamación, correlacionaron fuertemente con el tiempo de evolución del cuadro clínico. Sin embargo, en el caso de los pacientes DM2 que recibieron insulina esta correlación es más “débil” (o menos significativa) que en el caso de los pacientes que recibieron solo hipoglucemiantes orales.

Especialmente notable es este efecto para la concentración de tromboxano-B2 y la de óxido nítrico (en plasma) que directamente *no correlacionaron* a niveles estadísticamente significativos cuando los pacientes DM2 fueron insulinizados.

Si se toman las variables antes estudiadas y se las pondera o ajusta por la duración del cuadro clínico, es posible efectuar una correlación cruzada entre ellas, lo que resulta en los datos mostrados en las Tablas 14-A y 14-B para DM2 bajo esquemas terapéuticos HO y HO+I, repectivamente. En este otro tipo de análisis pudieron verse correlaciones significativas y muy significativas para todos los pares de variables tanto dentro del sector de pacientes HO como dentro de los HO+I (a su vez, para estos últimos con independencia del tipo de insulina empleado), que indicaron múltiples dependencias significativas entre variables con implicancias desde el punto de vista aplicado que se discutirán en la siguiente sección. En general, y con fines simplificativos podemos decir que se observó una clara correlación negativa entre marcadores de daño por estrés oxidativo (FRAP, PCs, TBARS, [NOx], etc.) y marcadores de disfunción endotelial (DiEnDi), agregación y/o

inflamación, lo cual reviste suma importancia clínica en cuanto a que los primeros se podrían emplear como indicadores (evaluadores indirectos) de los segundos (Tabla 14-A). Otra conclusión general importante que emerge de estos resultados es que estas dependencias son menos marcadas para la mayoría de los pares correlacionados en el caso de agregarse algún tipo de insulina al tratamiento (Tabla 14-B).

**Tabla 13. Coeficientes de correlación entre las variables seleccionadas y el tiempo de evolución bajo tratamiento**

Parámetros	Subgrupos	
	HO	HO+I
PCs	0.49 (0.04)	0.35 (0.02)
TBARS	0.59 (0.01)	0.30 (0.05)
Ensayo FRAP	- 0.44 (0.02)	- 0.46 (0.02)
Vitamina E	- 0.78 (0.01)	- 0.51 (0.05)
GSH/GSSG	- 0.52 (0.02)	- 0.45 (0.02)
AGEs	0.44 (0.02)	0.37 (0.02)
Homocisteína	0.32 (0.01)	0.28 (0.05)
Ox-LDL/LDL	0.68 (0.01)	0.50 (0.02)
Endotelina-1	0.37 (0.05)	0.32 (0.05)
Fibrinógeno	0.43 (0.01)	0.32 (0.05)
IL-1 $\beta$	0.34 (0.05)	0.30 (0.05)
PCRus	0.32 (0.02)	0.28 (0.05)
FNT- $\alpha$	0.27 (0.05)	0.25 (0.05)
TBX-B2	0.26 (0.05)	0.17 (ns)
Oxido nítrico; [NOx]	0.46 (0.02)	0.19 (ns)
Factor vW	0.38 (0.02)	0.30 (0.05)
CRP	0.40 (0.01)	0.28 (0.05)
VCAM-1	0.44 (0.02)	0.27 (0.05)

*Los datos fueron correlacionados tal como se ha descrito en la sección de métodos estadísticos y el nivel de significación se indica entre paréntesis para cada caso (ns, no significativo o  $p > 0.05$ ).*

**Tabla 14-A. Correlación entre pares de variables seleccionadas ajustadas por tiempo de evolución para pacientes DM2 con esquema de tratamiento HO**

Parámetros	TBARS	FRAP	Vit. E	GSH / GSSG	AGEs	HCys	Ox-LDL / LDL	EN-1	Fib	IL-1 $\beta$	PCRus	FNT- $\alpha$	TBX-B2	[NOx]	vWF	CRP	VCAM-1
PCs	0.42	-0.35	-0.29	-0.31	0.25	0.27	0.32	0.26	0.39	0.29	0.28	0.33	0.34	0.42	0.40	0.37	0.35
TBARS		-0.49	-0.65	-0.39	0.30	0.27	0.58	0.28	0.31	0.31	0.30	0.35	0.32	0.46	0.42	0.33	0.38
FRAP			-0.43	-0.37	-0.52	-0.26	-0.41	-0.24	-0.34	-0.30	-0.29	-0.33	-0.22	0.24	-0.27	-0.31	-0.29
Vit. E				-0.45	-0.44	-0.28	-0.67	-0.25	-0.33	-0.37	-0.44	-0.51	-0.55	-0.30	-0.33	-0.23	-0.38
GSH/GSSG					-0.67	-0.35	-0.40	-0.25	-0.24	-0.26	-0.39	-0.63	-0.30	-0.46	-0.29	-0.25	-0.38
AGEs						0.27	0.55	0.22	0.36	0.41	0.35	0.33	0.29	-0.33	0.27	0.40	0.66
HCys							0.49	0.34	0.37	0.34	0.30	0.39	0.42	-0.51	0.41	0.36	0.59
Ox-LDL/LDL								0.28	0.46	0.35	0.37	0.26	0.29	-0.23	0.25	0.44	0.37
EN-1									0.28	0.30	0.28	0.43	0.61	-0.28	0.27	0.25	0.46
Fib										0.38	0.30	0.33	0.51	-0.26	0.43	0.30	0.57
IL-1 $\beta$											0.29	0.36	0.38	-0.27	0.40	0.26	0.44
PCRus												0.33	0.29	-0.30	0.28	0.46	0.40
FNT- $\alpha$													0.35	-0.24	0.43	0.38	0.51
TBX-B2														-0.25	0.41	0.36	0.38
[NOx]															-0.28	-0.22	-0.23
vW F																0.33	0.30
CRP																	0.39

*No se indican los valores exactos para cada p pero en todos los casos corresponden a significaciones  $\leq 0.05$ .*

**Tabla 14-B. Correlación entre pares de variables seleccionadas ajustadas por tiempo de evolución para pacientes DM2 con esquema de tratamiento HO+I**

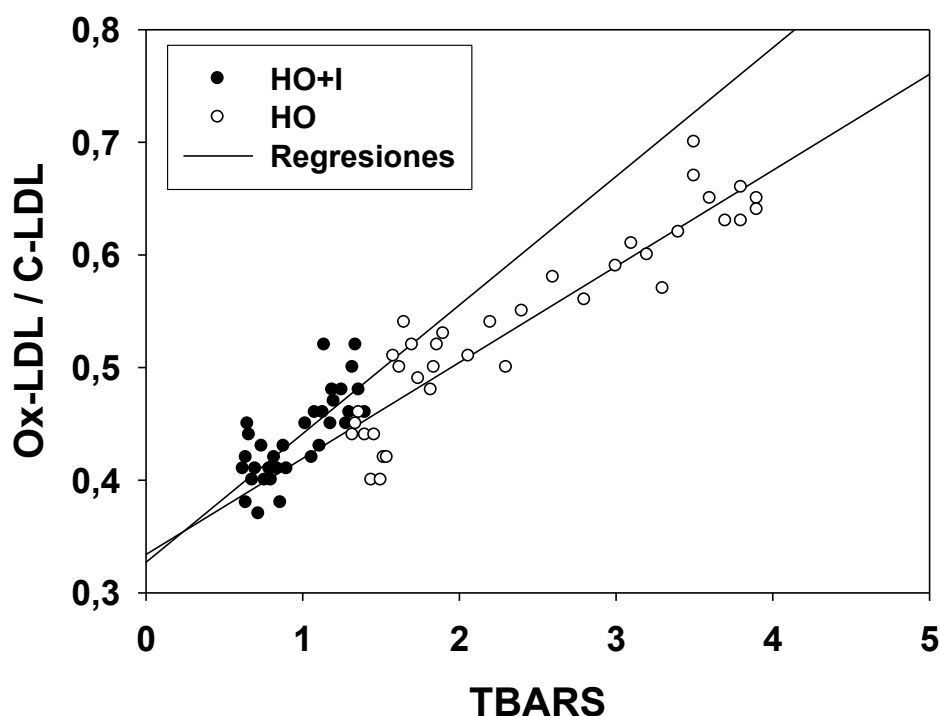
Parámetros	TBARS	FRAP	Vit. E	GSH / GSSG	AGEs	HCys	Ox-LDL / LDL	EN-1	Fib	IL-1 $\beta$	PCRus	FNT- $\alpha$	TBX-B2	[NOx]	vWF	CRP	VCAM-1
PCs	0.35	-0.30	-0.22	-0.26	0.21	0.20	0.28	0.22	0.30	0.22	0.23	0.30	0.28	0.38	0.38	0.35	0.33
TBARS		-0.38	-0.41	-0.29	0.26	0.25	0.47	0.22	0.25	0.34	0.26	0.31	0.30	0.42	0.35	0.30	0.38
FRAP			-0.36	-0.31	-0.32	-0.21	-0.33	-0.25	-0.30	-0.24	-0.23	-0.29	-0.20	0.22	-0.25	-0.32	-0.30
Vit. E				-0.38	-0.34	-0.25	-0.42	-0.21	-0.30	-0.31	-0.32	-0.42	-0.43	-0.26	-0.30	-0.24	-0.30
GSH/GSSG					-0.44	-0.30	-0.34	-0.22	-0.22	-0.24	-0.30	-0.44	-0.25	-0.40	-0.29	-0.22	-0.32
AGEs						0.23	0.40	0.20	0.32	0.32	0.31	0.30	0.22	-0.30	0.25	0.35	0.45
HCys							0.31	0.28	0.31	0.30	0.25	0.32	0.35	-0.41	0.36	0.32	0.40
Ox-LDL/LDL								0.23	0.33	0.31	0.31	0.23	0.23	-0.21	0.23	0.40	0.31
EN-1									0.25	0.25	0.26	0.35	0.46	-0.23	0.22	0.23	0.42
Fib										0.33	0.28	0.30	0.41	-0.22	0.40	0.29	0.39
IL-1 $\beta$											0.26	0.31	0.32	-0.21	0.36	0.25	0.35
PCRus												0.29	0.24	-0.29	0.25	0.42	0.33
FNT- $\alpha$													0.33	-0.23	0.40	0.34	0.40
TBX-B2														-0.25	0.38	0.34	0.31
[NOx]															-0.26	-0.23	-0.20
vW F																0.34	0.25
CRP																	0.30

*No se indican los valores exactos para cada p pero en todos los casos corresponden a significaciones  $\leq 0.05$ .*



Otra comprobación contundente sobre el efecto beneficioso del empleo de alguna forma de insulina como componente de la terapia, se la obtiene haciendo análisis de regresión lineal y correlación con los datos de ambas poblaciones para pares de variables. Esta estrategia se muestra como ejemplo en la Figura 7 en donde se seleccionaron dos variables con alta correlación positiva para ambas poblaciones (según datos mostrados en Tablas 14-A y 14-B).

**Fig.7. Regresiones en modelo lineal para las variables Ox-LDL/colesterol-LDL vs TBARS en las dos poblaciones de pacientes**



Se observaron claramente dos nubes de datos prácticamente sin solapamiento entre ellas que se hallan situadas a rangos de valores mas bajos y acotados para el caso de pacientes DM2 con tratamiento HO+I que para los tratados con HO solamente. Los coeficientes de correlación para el ajuste lineal fueron muy altos ( $0.95 < r^2 < 0.98$ ). Se efectuaron regresiones y correlaciones similares para varios pares de variables tales como VCAM-1/AGEs y VCAM-1/ FNT- $\alpha$  y otras (no mostradas), que si bien no resultaron tan discriminativas como la anterior, exhibieron dos grupos de datos nítidamente separados en función de la estrategia terapéutica. Como ejemplos se muestran los resultados en las Figs. 8 y 9 con  $r^2$  muy significativos y similares a los antes mencionados.

Fig. 8. Regresiones en modelo lineal para las variables VCAM-1 vs FNT- $\alpha$  en las dos poblaciones de pacientes

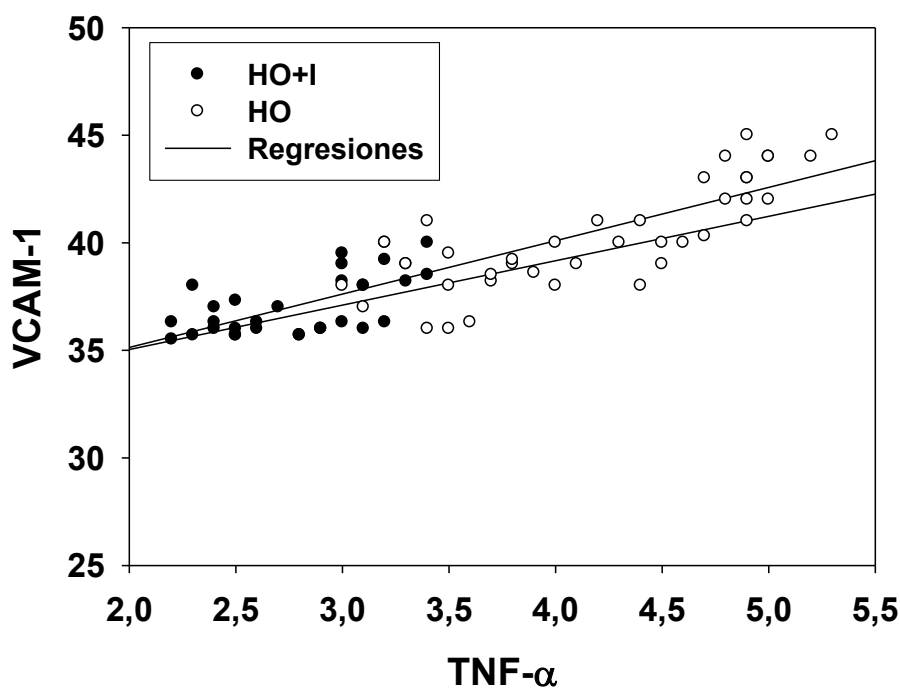
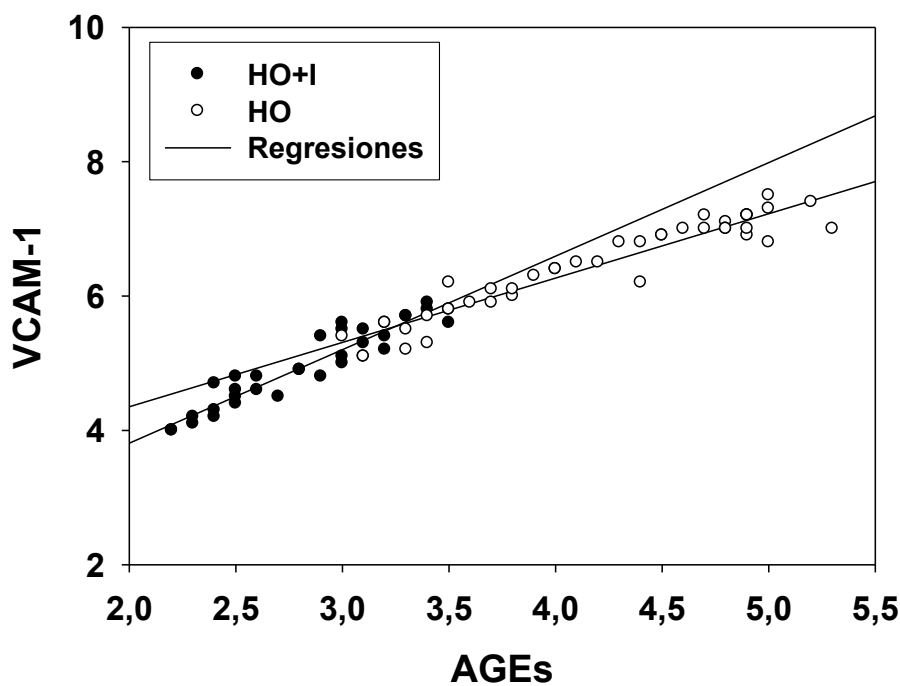


Fig. 9. Regresiones en modelo lineal para las variables VCAM-1 vs AGEs en las dos poblaciones de pacientes



Cuando se analizan algunas otras correlaciones ajustadas por IMC y tiempo de evolución en *todos* los integrantes del grupo paciente (prescindiendo del tipo de tratamiento) se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 15. La conclusión

general más sobresaliente es que los pacientes DM2 están en una situación proclive a la elevación de los biomarcadores de lipogénesis en el tejido adiposo (correlacionados positivamente con las concentraciones de insulina) y a la inflamación via  $\text{TNF-}\alpha$  que se vincula negativamente con el nivel de colesterol en HDL y con la concentración de AN. Si bien AN depende directamente de los marcadores de depósito de TAG (Apo-B100, Lp(a) y el mismo valor de la insulinemia), al mismo tiempo correlaciona muy significativamente y en forma directa con la concentración de HDL. Esto hace muy difícil interpretar cuál sería el efecto *neto* en esta población farmacológicamente heterogénea. Al repetir estos mismos estudios de correlación pero en las poblaciones de pacientes DM2 en forma separada (HO o HO+I) (no mostrado), se obtienen datos similares a los anteriores en cuanto a que por un lado hay una correlación positiva entre insulinemia y marcadores de lipogénesis, pero simultáneamente ocurre una correlación negativa muy fuerte en los tratados con insulina (no significativa o poco significativa en el sub-grupo HO) que involucra a  $\text{TNF-}\alpha$  y colesterol en HDL, al tiempo que se hace importante la correlación positiva con AN (eso explicaría porqué en estos pacientes observamos AN con valores mas cercanos a los de los controles; Tabla 9).

**Tabla 15. Coeficientes de correlación múltiple entre variables para los sub-grupos DM2 ajustados por tiempo de evolución clínica e índice de masa corporal**

Variables	HDL-C	TNF- $\alpha$	Ins	Apo-B100	TAG	Lp(a)
<b>AN</b>	0.51 (0.01)	- 0.29 (0.05)	0.27 (0.05)	0.24 (0.05)	0.22 (0.05)	0.17 (ns)
<b>HDL-C</b>		- 0.33 (0.05)	0.08 (ns)	- 0.39 (0.01)	- 0.30 (0.05)	- 0.29 (0.05)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			- 0.38 (0.01)	0.23 (0.05)	0.15 (ns)	0.21 (0.05)
<b>Ins</b>				0.40 (0.01)	0.36 (0.01)	0.28 (0.05)
<b>Apo-B100</b>					0.68 (0.01)	0.44 (0.01)
<b>TAG</b>						0.27 (0.05)

Los valores se tomaron en conjunto, prescindiendo de la administración del tipo de tratamiento. Entre paréntesis se indican los valores de *p* que se muestran para dos niveles de significación (0.01 y 0.05); ns, no significativo

## 5.5- Estudios de composición de ácidos grasos en diferentes materiales biológicos

Finalmente se mostrarán los resultados correspondientes a los análisis de ácidos grasos de lípidos totales en plasma, leucocitos periféricos, y fantasmas eritrocitarios, los cuales se implementaron como una estrategia para investigar si la condición del paciente se reflejaba en estos valores como biomarcadores de su estado metabólico general (no solo el dependiente en forma estricta de su condición hormonal, sino también como consecuencia del mayor daño por lipoperoxidación que es esperable en la condición de DM2).

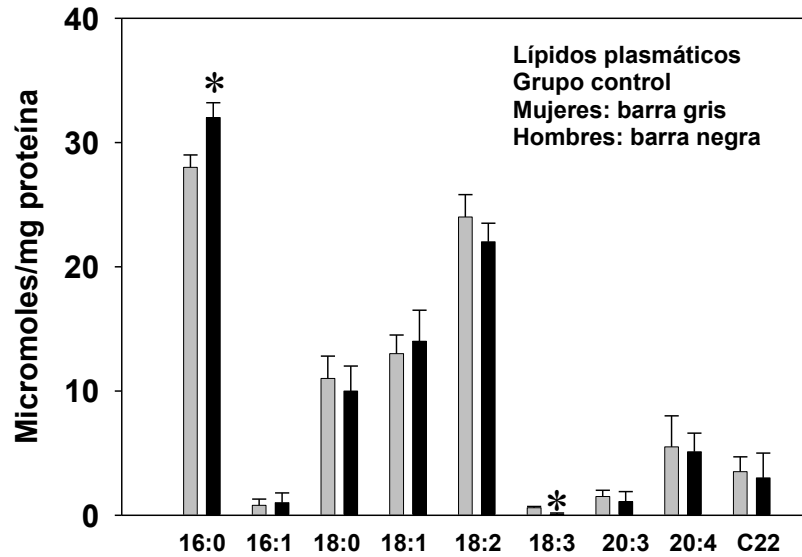
En primer término cabe resaltar que la composición de ácidos grasos (FAs) para los lípidos totales extraídos de los tres materiales biológicos analizados (plasma, leucocitos y membranas eritrocitarias) es significativamente distinta entre sí, tal como queda demostrado en las Figuras 10, 11 y 12. Notablemente los resultados de plasma y leucocitos exhibieron mayor dispersión en torno a la media poblacional que los obtenidos a partir de fantasmas de eritrocitos.

La figura 10 muestra el perfil de composición de FAs para lípidos totales de plasma de mujeres y hombres del grupo control. No se observaron diferencias asociadas al sexo excepto un incremento significativo del contenido de ácido palmítico (16:0) y un descenso del alfa-linolénico ( $\alpha$ -18:3) en las mujeres comparadas con los hombres.

Los FAs en lípidos totales leucocitarios (Fig. 11) mostró únicamente un mayor contenido de ácido palmítico en hombres comparados con mujeres ( $p < 0.05$ ) sin diferencias significativas para los otros FAs.

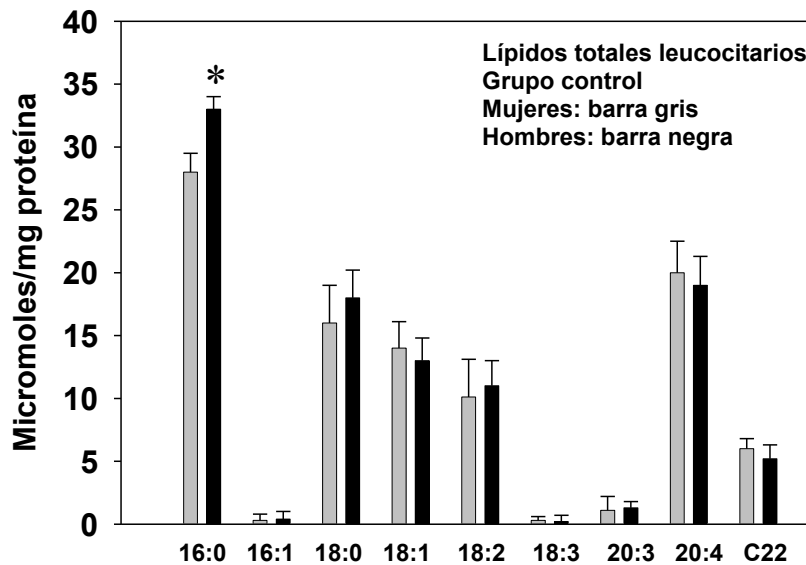
Se sabe que este tipo de determinaciones esta altamente influenciada por variables experimentales no controlables (en especial los hábitos dietarios y el desempeño hepático). Sin embargo, la dispersión de los datos resultó en general muy baja y el nivel de significación alcanzó a ser menor o igual a 0.05 para ambas comparaciones.

**Fig. 10. Composición de ácidos grasos en grupos control (discriminado por sexos) para lípidos totales plasmáticos**



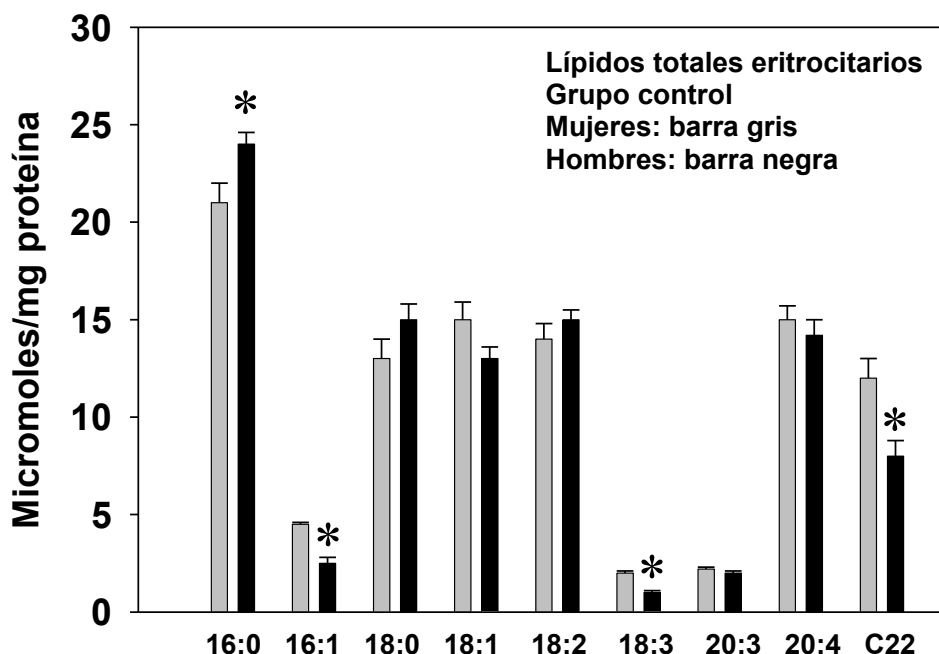
Los datos son el promedio  $\pm$  DS del  $n$  indicado en la sección Materiales y métodos. Están graficados en  $\mu$ moles por mg de proteína. C22: indica el total de ácidos grasos no identificados de 22 átomos de carbono o más, expresados como docosahexenoico. (\*)  $p < 0.05$  (o menor)

**Fig. 11. Composición de ácidos grasos en grupos control (discriminado por sexos) para lípidos totales leucocitarios**



Los datos son el promedio  $\pm$  DS del  $n$  indicado en la sección Materiales y métodos. Están graficados en  $\mu$ moles por mg de proteína. C22: indica el total de ácidos grasos no identificados de 22 átomos de carbono o más, expresados como docosahexenoico. (\*)  $p < 0.05$  (o menor)

**Fig. 12. Composición de ácidos grasos en grupos control (discriminado por sexos) para fantasmas eritrocitarios**



Los datos son el promedio  $\pm$  DS del  $n$  indicado en la sección Materiales y métodos. Están graficados en  $\mu$ moles por mg de proteína. C22: indica el total de ácidos grasos no identificados de 22 átomos de carbono o más, expresados como docosahexenoico. (\*)  $p < 0.05$  (o menor)

En la figura 12 se muestra la composición característica de los ácidos grasos de leucocitos humanos (grupo control). Mujeres y hombres tienen valores muy similares con excepción del palmítico (16:0) que se incrementa, y del palmitoleico (16:1) y alfa-linolénico ( $\alpha$ -18:3) que disminuyen en los varones respecto de las mujeres.

En las tablas 13, 14 y 15 se resumen los principales parámetros analíticos obtenidos para la composición de FAs de plasma, leucocitos y fantasmas eritrocitarios (respectivamente), en hombres y mujeres de los controles (C) y los dos subgrupos experimentales (DM2-HO y DM2-HO+I).

**Tabla 13. Principales resultados analíticos para la composición de FAs de plasma para los tres grupos experimentales**

Parámetros	Controles (C)		HO		HO + I	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Σ Saturados	39.6a	44.3b	43.5b	47.8c	41.2a	44.9b
Σ Monoenoicos	13.8a	14.7a	12.7a	14.3a	14.0a	14.5a
Σ S / Σ M	2.9a	3.0a	3.4b	3.3b	3.0a	2.9a
Σ PUFAs	35.8a	31.3b	30.1b	26.2c	36.1a	30.8b
Σ S / Σ PUFAs	1.1a	1.4b	3.4c	3.3c	2.9d	3.1c
n-3/n-6	2.0a	0.9b	1.9a	0.9b	2.0a	1.0b
20:4 n-6	5.1a	4.9a	3.8b	3.5b	5.2a	5.0a
18:2n-6/20:4n-6	4.9a	4.5a	6.8b	6.7b	4.8a	5.0a
C22	3.1a	2.9a	1.9b	2.0b	3.0a	2.8a
INS	121.3a	95.7b	88.8b	70.2c	110.3d	86.4b

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  DS en micromoles/mg. prot. "S", saturados; "M", monoenoicos; "PUFAs", FAs polinsaturados; "C22", otros FAs no identificados de 22 átomos de C o más, "INS", índice de no saturación. Las letras diferentes entre si dentro de cada fila indican valores significativamente distintos para  $p < 0.05$ . Por simplicidad se omitieron las desviaciones Standard que se mantuvieron dentro del rango 3-9 % del valor de la media para cada dato.

**Tabla 14. Principales resultados analíticos para la composición de FAs de leucocitos para los tres grupos experimentales**

Parámetros	Controles (C)		HO		HO + I	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Σ Saturados	43.1a	53.0b	46.8c	57.0c	43.3a	54.4b
Σ Monoenoicos	15.5a	14.2a	14.9a	15.0a	15.1a	14.7a
Σ S / Σ M	2.7a	3.7b	3.1c	3.8d	2.9a	3.7b
Σ PUFAs	39.2a	33.4b	35.4c	29.0d	40.2a	32.5b
Σ S / Σ PUFAs	1.1a	1.6b	1.3c	2.0d	1.1a	1.7b
n-3/n-6	0.6a	0.7a	0.5a	0.7a	0.6a	0.6a
20:4 n-6	21.6a	20.2a	17.3b	17.0b	20.8a	19.9a
18:2n-6/20:4n-6	0.5a	0.6a	0.9b	1.0b	0.6a	0.5a
C22	6.0a	5.8a	4.0b	4.1b	5.8a	5.7a
INS	122.5a	120.0a	90.3b	87.8b	111.9a	115.1a

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  DS en micromoles/mg. prot. "S", saturados; "M", monoenoicos; "PUFAs", FAs polinsaturados; "C22", otros FAs no identificados de 22 átomos de C o más, "INS", índice de no saturación. Las letras diferentes entre si dentro de cada fila indican valores significativamente distintos para  $p < 0.05$ . Por simplicidad se omitieron las desviaciones Standard que se mantuvieron dentro del rango 3-9 % del valor de la media para cada dato.

**Tabla 15. Principales resultados analíticos para la composición de FAs de fantasmas eritrocitarios para los tres grupos experimentales**

Parámetros	Controles (C)		HO		HO + I	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Σ Saturados	35.2a	38.9b	36.6b	43.7c	35.5a	40.1b
Σ Monoenoicos	20.5a	18.6a	19.7a	19.1a	22.6a	20.1a
Σ S / Σ M	1.7a	2.1b	2.0b	2.3b	1.6a	2.0b
Σ PUFAs	49.3a	40.6b	35.2c	31.0d	48.7a	39.7b
Σ S / Σ PUFAs	0.7a	1.0b	1.1b	1.4c	0.7a	1.0b
n-3/n-6	5.2a	3.8b	5.0a	3.7b	5.3a	3.9b
20:4 n-6	15.7a	14.9a	10.1b	9.8b	14.7a	15.0a
18:2n-6/20:4n-6	1.0a	1.1a	1.9b	2.0b	0.9a	1.0a
C22	13.9a	8.7b	8.6b	6.1c	12.8a	8.8b
INS	182.9a	144.5b	101.1c	95.7c	176.4a	141.1b

*Los resultados están expresados como la media ± DS en micromoles/mg. prot. "S", saturados; "M", monoenoicos; "PUFAs", FAs polinosaturados; "C22", otros FAs no identificados de 22 átomos de C o más, "INS", índice de no saturación. Las letras diferentes entre sí dentro de cada fila indican valores significativamente distintos para  $p < 0.05$ . Por simplicidad se omitieron las desviaciones Standard que se mantuvieron dentro del rango 3-9 % del valor de la media para cada dato.*

Los datos de la Tabla 13 demuestran que - en comparación con el grupo control - los pacientes diabéticos tipo 2 poseen mayor proporción de ácidos grasos saturados en relación a los monoinsaturados, lo cual se traduce en un incremento de la relación entre ambos tipos de FAs. Asimismo, presentan menor contenido de FAs polinosaturados en general, y especialmente menor contenido de ácido araquidónico (20:4 n-6) y de otros ácidos grasos de larga cadena (C22) lo que conduce a una sustancial disminución del índice de no saturación (INS). El ácido linoleico (18:2 n-6), precursor de la serie esencial n-6, está aumentado en los DM2 presumiblemente como consecuencia de una menor metabolización a sus homólogos superiores. Un cuadro similar se observó en los resultados analíticos correspondientes a los leucocitos (Tabla 14) y fantasmas de eritrocitos (Tabla 15); sin embargo, en este último caso los cambios fueron mucho más pronunciados que en los otros materiales biológicos analizados.

La administración de cualquier forma de insulina causó una reversión de estas anomalías composicionales en los tres tipos de muestras analizadas. En algunos casos la reversión fue completa y los resultados se acercaron a los controles haciéndose estadísticamente indistinguibles entre sí, y en otros casos fue parcial con un mejoramiento significativo (Tablas 13 a 15). Para apreciar más claramente la magnitud del efecto causado por la suplementación con insulina (el cual no dependió del régimen o tipo de insulina empleada) se muestran los

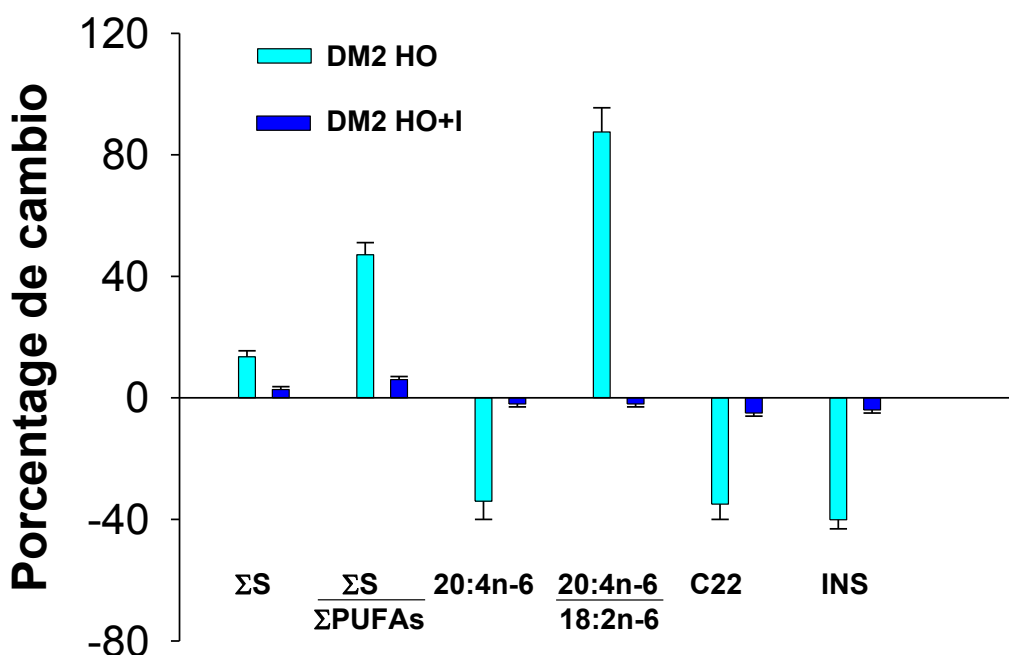


porcentajes de cambio - como promedios  $\pm$  DS - de algunos parámetros analíticos principales calculados en el total de cada subgrupo (Figura 13). Recordemos que los porcentajes de cambio son parámetros *relativos al control* calculados como  $PC(X')$  según la expresión:

$$PC(X') = [X - C].100 / C$$

En donde  $X'$  es el parámetro en cuestión en el grupo DM2 (HO ó DM2 HO+I) respecto a ese mismo parámetro ( $X$ ) en el grupo que ofició como referencia ( $C$ ). Este cálculo opera como un *normalizador* que nivela las oscilaciones individuales del parámetro  $X'$  debido a cuestiones *propias del paciente*, no controlables en el estudio, y atribuibles a variables tales como su dieta particular, la edad, el sexo, y los esquemas terapéuticos específicos y generales que esté recibiendo, o también otros factores no necesariamente inherentes a la patología de base cuyos efectos sobre el análisis de ácidos grasos podrían ser desconocidos al presente.

**Fig. 13. Porcentajes de cambio de los principales parámetros analíticos en membranas eritrocitarias de pacientes DM2 (HO o HO+I) respecto a controles**



Los resultados son la media  $\pm$  DS y todas las parejas de barras son significativamente diferentes para  $p < 0.05$  (o menor)

Observando la Fig. 13 se concluye que la administración de insulina provoca un cambio profundo y muy significativo en la composición de los ácidos grasos acilados a lípidos totales de membranas eritrocitarias de modo que éstas resultan indistinguibles de las que se preparan a partir de la sangre de los controles. Es importante resaltar que los datos mostrados fueron calculados considerando el total de los integrantes de cada sub-población; sin embargo, un cálculo similar discriminando por sexos arroja la misma conclusión general.

Otros estudios estadísticos (no mostrados) conducen a las siguientes afirmaciones: (i) los cambios provocados por el agregado de insulina no dependen del tipo de insulina, su posología, o el tiempo de administración (para cotas de tiempo como las empleadas en este estudio), y (ii) los cambios inducidos por el agregado de insulina son de una magnitud mucho mayor en las membranas de eritrocitos, de grado intermedio en lípidos totales de leucocitos, y de menor cuantía en los lípidos plasmáticos.

Debido a la dificultad que supone el aislamiento, caracterización, y purificación de las diferentes lipoproteínas plasmáticas, no es posible comentar si estas alteraciones descritas para la composición de ácidos grasos se reflejaron también en la composición de acilos de sus lípidos. Debido al rol central que poseen las lipoproteínas en el transporte y metabolismo lipídico se intuye que esto sería altamente factible; sin embargo, este análisis no surge como algo sencillo de implementar en categoría de biomarcador para un laboratorio de Bioquímica Clínica de baja o mediana complejidad.

## Discusión

---

*“Una palabra como todas las demás  
solo con otras palabras puede ser explicada.  
Pero como las palabras que intentan explicar, lo consigan o no,  
tienen a su vez que ser explicadas por otras,  
nuestro discurso avanzará sin rumbo  
y alternará como una maldición el error con la certeza,  
sin dejarnos ver lo que está bien de lo que está mal”.*

*(del “Viaje del elefante”)*

*- José Saramago -*

## 6.- Discusión

Parte de los hallazgos encontrados en este trabajo coinciden con estudios previos en donde se reportó una clara condición de estrés oxidativo en pacientes con DM2 y un cuadro pro-inflamatorio (Clapp et al, 2004; Accinni et al, 2006; Glorian y Limon, 2006; Sprague y Khalil, 2009), pro-aterogénico (dislipémico y pro-agregante) (Rivara et al, 2006; Kohen Avramoglu et al, 2006; Gómez et al, 2009; Salcedo et al, 2010). Estas características acompañan (algunas causativamente) a una disfunción endotelial que es el hallazgo mas novedoso o mas recientemente descrito para esta patología (Badimón y Martínez-González, 2006; Imrie et al, 2009; Herrera et al, 2010). De modo que nos concentraremos en aquellos aspectos de los resultados que involucran un enfoque más novedoso en cuanto al empleo de los biomarcadores emergentes como evaluadores pronósticos y, más específicamente, de eficacia terapéutica en pacientes DM2.

La cantidad de evidencia experimental y epidemiológica reunida en torno a las características evolutivas del cuadro clínico de la DM2 hacen aún más sorprendente el hecho de no haberse aceptado internacionalmente y de manera indiscutible un protocolo que combine a los hipoglucemiantes orales con apropiadas dosis de insulina (UKPDS, 1998; Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011). En algún momento este tipo de recomendaciones farmacológicas o terapéuticas estuvo en franca discusión (UKPDS, 1998) y existió siempre y hasta ahora una enorme reticencia de parte del profesional Médico a indicar este tratamiento por el riesgo de hipoglucemia y por la falta de adherencia demostrada por los pacientes (Weissman, 2002; American Diabetes Association, 2002). Sin embargo, hoy en día existen ya sobradas razones para considerar a la administración de algún tipo de insulina como imprescindible en la mayoría de los pacientes DM2 (sino en todos ellos) y descartar la idea de implementarla solamente en aquellos casos de DM2 severa o incontrolable con las medidas tradicionales. Este último es el criterio clínico que se viene imponiendo, sobre todo ante las complicaciones ya mencionadas de aceptación/adherencia de parte del paciente, el riesgo de hipoglucemia y la probable acción pro-aterogénica (lipogénica mas precisamente) que pudiera ejercer la insulina. Sobre éste último punto volveremos mas adelante en detalle.

La insulina, tal como se mencionó en la parte introductoria, lleva a delante muchos otros efectos además del de controlar puntualmente el metabolismo de

hidratos de carbono. Ya en 2006 se estableció cabalmente que no existe ningún esquema farmacológico a base de hipoglucemiantes orales (solos o en combinación) que a través del control de la glucemia disminuya o prevenga las complicaciones tardías de la DM2 (Garg y Ulrich, 2006). Desde hace décadas se ha intentado evaluar si el control de la glucemia era un marcador confiable de evolución clínica hasta que quedó claramente establecido que, aún en pacientes DM2 con glucemia aceptable y *estable en el tiempo*, los hipoglucemiantes orales no evitan el deterioro metabólico subyacente que los conduce a inflamación crónica, estado dislipémico, pro-trombótico y pro-agregante, disfunción endotelial, insuficiencia renal, y daños al sistema nervioso central y periférico.

Desde el año 2000 se conoce cabalmente que el estado de estrés oxidativo inherente a la etiopatogenia y a la evolución de la DM2 requiere de intervenciones farmacológicas y/o dietarias tendientes a neutralizarlo, por las múltiples cascadas de señalización redox-dependientes ahora conocidas - y especialmente - por su rol crítico a la hora de provocar disfunción endotelial en los pacientes DM2 (Chowienyck et al, 2000). El grupo ACCORD instituido para delinear las mejores estrategias de tratamiento para pacientes DM2, publicó en 2007 el informe de su investigación multicéntrica en más de 10.000 pacientes diabéticos estableciendo claramente que la "normalización" del nivel de glucemia en sangre, lo mismo que el de fructosamina o de Hb A1c, no constituyen *per se* parámetros confiables en cuanto al riesgo cardiovascular por dislipemia y disfunción endotelial, y recomiendan terapias combinadas con hipoglucemiantes orales, antioxidantes, y dosis de insulina de las denominadas "premezcladas" (de largo efecto) y regulares o de corta acción (Gerstein et al, 2007). Mas recientemente se recomendó (en DM2 no insulinizados) la administración preferencial de metformina como hipoglucemiante oral precisamente debido a sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios destacables en comparación con otras drogas del mismo tipo (Chakraborty et al, 2010).

Los marcadores de normalización de la glucemia, tales como la hemoglobina glicosilada, continúan siendo confiables para monitorear promedialmente el nivel de glucosa en los tres meses precedentes al análisis (Chonchol et al, 2010) y hay muchos autores que aún actualmente le adjudican gran valor predictivo en cuanto al riesgo cardiovascular (Van Hateren et al, 2011). Sin embargo, otros investigadores del área clínica piensan que no reflejan en absoluto los diversos riesgos subyacentes que se desarrollan a lo largo del curso de la patología, y que se hallan especialmente relacionados con la inflamación, insuficiencia renal, neuritis, y la

incompetencia endotelial o las enfermedades degenerativas que ven incrementada su incidencia en los DM2 (Huang et al, 2011; Dailey, 2011).

Con el fin de complementar la terapia basada solo en hipoglucemiantes orales sin recurrir a la administración de insulina se han hecho diversos intentos que van desde el empleo de antioxidantes (Palacka et al, 2010; Suksomboon et al, 2011; García-Medina et al, 2011) - estrategia para lo cual no todos los autores encontraron resultados positivos (Golbidi et al, 2011) - hasta las recomendaciones dietarias tendientes a regular el nivel de adiponectina (González-Rodríguez et al, 2009), la suplementación con arginina o moduladores de la óxido-nítrico sintetasa (Das et al, 2011), administración de vitaminas, ácidos grasos, o componentes dietarios muy específicos (Abete et al, 2011; Mitri et al, 2011; Kelley et al, 2011). Sin embargo, ninguno de estos intentos ha resultado tan beneficioso como la implementación de un régimen farmacológico mixto con hipoglucemiantes orales y diferentes tipos de insulina (Blicklé et al, 2009; Ametov et al, 2010; Porcellatti et al, 2011) ahora ampliamente disponibles gracias a la posibilidad de obtenerlas en su forma recombinante (por ingeniería genética). Los investigadores clínicos que apoyan decididamente esta combinación farmacológica, en general sugieren que se destine a pacientes DM2 con Hb A1c igual o superior a 7 % (Blicklé et al, 2009).

Creemos que nuestras determinaciones refuerzan esta recomendación al demostrar de manera fehaciente que todos los marcadores de inflamación, agregación plaquetaria, dislipemia y estrés oxidativo que conforman la constelación de parámetros que caracterizan la disfunción endotelial se mejoran significativamente en el grupo HO+I respecto del HO. Esta conclusión es coincidente con las posturas terapéuticas más modernas o recientes en donde se han hecho estudios retrospectivos para el ajuste del tipo y dosis de insulina a emplear a fin de evitar los riesgos por hipoglucemia que pueden acompañar a la administración de la hormona (Tibaldi et al, 2011). No obstante este riesgo (el cual puede ser ponderado apropiadamente para cada paciente) los beneficios del empleo de insulina a largo plazo resultan evidentes, y esta postura es la sustentada por muchos autores que preconizan su empleo por sobre los esquemas que combinan diferentes tipos de hipoglucemiantes orales (Mori, 2010; Kerr y Olateju, 2011). Lo interesante de esta discusión es que las investigaciones se están centrando en la posología y el tipo de insulina mas apropiados para cada paciente DM2, pero se está encontrando (tal como lo indican nuestros resultados) que *todas* las formas de insulina comercialmente disponibles son igualmente efectivas en su acción sobre la

disfunción endotelial (Blicklé et al, 2009; Ametov et al, 2010; Porcellatti et al, 2011). Incluso, para el confort de los pacientes, ya han avanzado significativamente los estudios tendientes a emplear insulina en forma de un preparado oral en lugar de la tradicional administración por inyección subcutánea (Kapitza et al, 2010). Este reciente recurso farmacotécnico mejorará ostensiblemente la adherencia al tratamiento porque disminuirá sensiblemente el rechazo natural que sienten los pacientes a inyectarse en forma rutinaria (también se cree que disminuirá significativamente el riesgo de hipoglucemia asociada a su empleo).

Un corolario importante derivado de nuestras determinaciones lo constituye el estudio de la interrelación (correlaciones) entre biomarcadores para los diferentes aspectos pronósticos o evolutivos de la DM2. Otros autores ya habían explorado estas correlaciones o interdependencias. Por ejemplo, se habían investigado las correlaciones entre los niveles de insulina y HOMA, o insulina y óxido nítrico o factor von Willebrand (Ouviña et al, 2004), y más recientemente fibrinógeno y depuración de creatinina o relación albúmina/creatinina, BMI, IL-6 o PCR (Duc Son et al, 2008), FNT- $\alpha$  e insulina, BMI, u HOMA (Mishima et al, 2001). Sin embargo, nuestros datos no solo demuestran una compleja red de interconexiones entre los biomarcadores de inflamación, daño por estrés oxidativo, y disfunción endotelial; sino que agregan una clara definición entre estas correlaciones para las dos poblaciones en estudio demostrando que la insulina (sin importar la forma farmacéutica empleada) mejoró substancialmente la condición general de los pacientes DM2.

Los resultados encontrados eran esperables si se consideran los múltiples efectos biológicos de la insulina. Desde hace unos seis años se conocen las propiedades antiinflamatorias de la insulina y el efecto restaurador de la dislipemia como así también su acción normalizadora del cociente Ox-LDL/C-LDL en pacientes DM2 (Galland et al, 2008). Todos estos beneficios se observaron claramente a través de nuestras determinaciones de los biomarcadores de metabolismo lipídico y riesgo aterogénico, pero quizás de manera más importante para marcadores emergentes o no tradicionales como el cociente Apo-B100/Apo-A1 y triglicéridos/C-HDL que, junto con el nivel de Lp(a), se los considera últimamente como los principales índices con elevada capacidad predictiva o evolutiva de riesgo cardiovascular en DM2 (Gómez et al, 2009; Kaur et, 2012; Qui y Qui, 2012; Kadoglou et al, 2012; Gazzaruso et al, 2012).

En línea con lo antes dicho, se sabe que los pacientes DM2 tratados con insulina incrementan significativamente los receptores para LDL y mejoran

sustancialmente el metabolismo de estas partículas lipoproteicas tal como fuera demostrado por vez primera por Duvillard et al (2003). Asimismo se cree que la insulina disminuye la *glicación* (o glicosilación) de los receptores LDL que de esa manera quedan mejor protegidos frente al estrés oxidativo, y también el nivel de triglicéridos en estas mismas partículas lipoproteicas (Duc Son et al, 2008).

Se conoce también desde hace años que en modelos animales de diabetes tipo 2 (por ejemplo en ratas alimentadas con dietas ricas en fructosa) la administración de insulina reduce *per se* - y no a través del control de la glucemia - los niveles de reactantes de fase aguda o crónica (tales como PCR, CRP, Fib, vWF), disminuye la acumulación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS, RNS), la producción de interleuquinas (IL-1 y -6, especialmente), las moléculas de adhesión como el VCAM-1, y tiende a restaurar los niveles de endotelina-1 y de FNT- $\alpha$ . Algunos de estos hallazgos se han observado en pacientes DM2 tanto por otros investigadores (Duc Son et al, 2008) como por nosotros.

Tal como se explicó en la Introducción, las células endoteliales liberan constantemente y en forma yuxtapuesta factores relajantes y constrictores que modulan el tono del músculo liso vascular. Bajo condiciones fisiológicas hay una liberación balanceada de estos factores (Cines et al, 1998; Vapaatalo y Mervaala, 2001). Ya mencionamos que la disfunción endotelial se define como un desbalance entre los factores relajantes y constrictores con un cuadro inflamatorio y pro-agregante conexo, y se la ha implicado en la fisiopatología de varios desórdenes cardiovasculares como hipertensión, vasculitis, daño renal, y neuritis (Cosentino y Luscher, 1998; Taddei et al, 2000; De Vriese et al, 2000). A pesar de que aún la patogénesis de la disfunción endotelial no se halla completamente dilucidada, se conocen fehacientemente cuáles son los marcadores más específicamente asociados a esta complicación en la DM2. El nivel de endotelina es uno de los más críticos. La endotelina (ET) es el vasoconstrictor endógeno más potente conocido a la fecha y tiene una acción fisiológica prolongada. Existe una familia de tres isopéptidos similares con actividad biológica de endotelina (ET-1, -2 y -3), cada uno codificado por genes distintos en los cromosomas 6, 1 y 20, respectivamente (Levin, 1995). La ET-1 es producida en las células endoteliales y en las células musculares lisas vasculares, en cambio, la ET-2 es producida predominantemente en el riñón y en el intestino (Haynes y Webb, 1993). La secreción de ET-1 ocurre en minutos luego de la exposición a estímulos inductores tales como catecolaminas, angiotensina II, glucocorticoides, citoquinas, radicales libres, *shear stress* e hipoxia.



Las células vasculares pueden así, rápidamente, ajustar la producción de ET para regular el tono vascular (Hopfner y Gopalakrishnan, 1999; Cowburn y Cleland, 2001). Hemos demostrado como la administración de insulina acerca los valores de endotelina-1 de los DM2 a los del grupo control haciéndose significativamente diferente al los del subgrupo DM2 tratado con hipoglucemiantes orales como único recurso farmacológico.

Dentro de las múltiples alteraciones observables, el incremento del nivel de óxido nítrico (probablemente como respuesta compensatoria a su menor biodisponibilidad) es característico y ha sido varias veces demostrado desde hace años en los DM2 (Ouviña et al, 2004). La disponibilidad de NO es un tema muy complejo en los pacientes DM2. En el estado clínico inicial existe una menor producción y disponibilidad de NO. Al principio, la producción de NO en los diabéticos está bloqueada por los productos de glicosilación avanzada (AGEs) y este bloqueo es tiempo-dependiente (con inicio a las 2 semanas y un pico máximo a los 2 meses). Pero luego, en los pacientes DM2 el estrés oxidativo se exagera y se produce una mayor cantidad de radicales libres del oxígeno (ROS) que a su vez inactivan al NO por formación de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) impidiendo el acoplamiento del agente vasodilatador al receptor endotelial (Halliwell y Gutteridge, 1989). El hecho es que después de algunos meses de evolución clínica la situación inicial cambia radicalmente quizás por adaptación del endotelio y sobre-activación de la biosíntesis de NO (las razones exactas de este cambio aún se desconocen).

Como es sabido, el NO es un potente vasodilatador endógeno biosintetizado por la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina a L-citrulina y NO. Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) descrita hace varios años (Mayer y Hemmens, 1997). Hay tres isoformas de esta enzima: la neuronal (nNOS), la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS). Las isoformas neuronal y endotelial de la NOS son *constitutivas* y su actividad depende de la cantidad de calcio-calmodulina presente en la célula; la eNOS en cambio puede ser activada por el denominado *shear stress*, la acetilcolina, bradiquinina, histamina, trombina, ADP y ATP. La isoforma iNOS es inducible por lipopolisacáridos y citoquinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ) que ha sido uno de los marcadores determinados en este estudio. Los macrófagos en reposo no expresan la enzima en forma substancial, pero la activación de estas células resulta en la producción explosiva e irreversible de óxido nítrico a expensas de la iNOS (Andrew y Meyer, 1999). Se cree que esto es un fenómeno *defensivo* ya que el NO

inhibe la agregación plaquetaria, la proliferación de las células musculares lisas, la adhesión de monocitos, y la expresión de moléculas de adhesión como el VCAM-1 que también hemos determinado en nuestros sub-grupos experimentales con niveles similares a los reportados por otros investigadores (Moncada y Higgs, 2002). Se ha descrito una *biodisponibilidad* reducida de NO en la enfermedad vascular, la hipertensión y la diabetes tipo 2 (Honing et al, 1998; Papapetropoulos et al, 1999). Parecería ser que la producción de óxido nítrico y sus efectos biológicos no siempre son cuestiones congruentes. También se han visto niveles muy elevados de metilargininas (con efectos deletéreos sobre la función endotelial, pro-agregantes/pro-trombóticos) en el plasma de pacientes con hipercolesterolemia, hipertensión, microangiopatía trombótica, y DM2 (aunque en este último caso los informes hasta la fecha son algo contradictorios) (Ruiz y Morosini, 2011). Se podría entonces hipotetizar que la acumulación de metilargininas endógenas podría ser consecuencia de la generación alterada de NO y/o de la producción aumentada de radicales superóxido, coincidiendo con lo propuesto por Masuda y Azuma (2002). El hecho cierto es que la insulina actúa con un claro efecto “normalizador” del nivel de NO y quizás (aunque no hayan sido específicamente determinados por la complejidad de su análisis) de la producción de RNS.

Hoy en día sabemos muy bien que el endotelio vascular media la habilidad de los vasos sanguíneos para alterar su arquitectura en respuesta a los cambios hemodinámicos. El endotelio normal funciona de manera *inhibidora*, manteniendo relajado el tono vascular y disminuyendo el crecimiento del músculo liso, la adhesión y agregación de plaquetas y leucocitos, y la subsecuente actividad tromboembólica. Es fácil comprender que una disminución de la función inhibitoria del endotelio vascular trae como consecuencia una respuesta vasoconstrictora con aumento de la resistencia vascular periférica y elevación de la presión arterial, estimulación del crecimiento del músculo liso vascular, y aumento de la adhesión y agregación plaquetarias con efectos trombogénicos. Numerosos trabajos demuestran que el NO derivado del endotelio es el que contribuye de forma más crítica a esta remodelación, participando de una manera central como un *regulador negativo* de la proliferación del músculo liso vascular además de ser un vasodilatador. Asimismo, su papel como *scavenger* de radicales libres locales está menos claro, pues de hecho puede convertirse en un promotor de estrés oxidativo bajo ciertas circunstancias, sobre todo ante la hiperproducción ROS típica de los pacientes DM2 (Thippeswamy et al, 2006; Kobata et al, 2007). Sin embargo, este efecto biológico

protectivo (como así también los mencionados anteriormente) no puede ser descartado a la fecha y se requieren mas estudios para su completa dilucidación.

Otra posible contribución de la DM2 a la disfunción endotelial NO-dependiente es el empeoramiento del perfil lipídico que acompaña a esta enfermedad. Se ha demostrado que la hipercolesterolemia contribuye al déficit intracelular de arginina lo que a su vez causa una menor producción de NO a expensas de la sintetasa y un aumento de la endotelina-1 haciendo predominar la respuesta vasoconstrictora. De modo que el panorama real implicaría niveles de NO mucho más altos que los observados de no ser por este efecto sobre la disponibilidad de sustrato endógeno. Ya hemos comentado el rol central de la ET-1 en este proceso, pero aquí insistiremos en destacar que en su mecanismo de acción intervienen dos tipos de receptores: A y B (ET-A y ET-B). El receptor ET-A se encuentra en el músculo liso y media el efecto vasoconstrictor, presor y mitogénico de la ET-1. Es un receptor ligado a las proteínas G que, al recibir al agonista genera IP3, DAG y, sobre todo, aumento del Ca iónico intracelular, segundos mensajeros que causarán finalmente el efecto biológico. El receptor ET-B, que se encuentra en el endotelio, produce liberación de óxido nítrico y prostaciclina. De modo que la ET-1 puede tener un efecto bifásico, vasoconstrictor y vasodilatador al mismo tiempo, y el mecanismo de esta interrelación no está suficientemente aclarado. Hasta el momento no se ha podido determinar fehacientemente en la DM2 con hipertensión una hiperfunción vasoconstrictora de la endotelina. En nuestros pacientes los DM2 con o sin hipertensión se comportaron frente al suplemento de insulina en forma completamente equivalente, lo que nos sugiere un aparente divorcio del efecto de la hormona respecto de la presión arterial del paciente (sin embargo, el número de casos estudiados podría ser insuficiente como para hacer una aseveración concluyente). Es decir, en el DM2 el endotelio se encuentra *activado*, pero el aumento de la producción local de endotelina en la pared vascular regularía hacia abajo (*down regulation*) el número de receptores de la misma, con lo cual disminuiría su respuesta presora. Debido a que ocurre también un aumento de la expresión del mRNA para endotelina en vasos de hipertensos severos, sodio-sensibles, y en pacientes con preeclampsia, probablemente todo esto juegue un papel central en la hipertrofia vascular que se encuentra exacerbada en los DM2 hipertensos. Ya comentaremos luego que los productos avanzados de glicosilación también tendrían su rol en este asunto.

Se ha demostrado asimismo un aumento en la síntesis renal de ET-1 en las enfermedades renales crónicas que cursan con proteinuria, lo cual es muy frecuentemente observado en pacientes DM2. Hay evidencias experimentales que indican que las endotelinas podrían tener una participación central en el daño a órganos blanco que acompaña a la DM2 con hipertensión arterial (riñones, cerebro) y que el efecto de la endotelina en la etiopatogenia de estos daños podría basarse en las complejas interacciones endotelina-sistema renina-angiotensina-óxido nítrico.

Cuando el endotelio es “disfuncional” no sólo pierde su capacidad reguladora del tono vascular, sino también sus propiedades antitrombóticas y antiadhesivas para los leucocitos y las plaquetas. Es por eso que nos interesó sobremanera la determinación de biomarcadores involucrados en este aspecto de la fisiopatología vascular del paciente DM2. Los cambios vasculares que se describen en los pacientes DM2 (sobre todo con HTA concomitante) consisten en el aumento del grosor de la capa media vascular en todos los vasos (grandes, medianos, pequeños y arteriolas) como una respuesta adaptativa de la pared arterial para regular el flujo local. Como dato curioso, mencionaremos que en modelos animales, estos cambios estructurales son de hipertrofia en los grandes vasos pero acompañados de hiperplasia en las pequeñas arterias y arteriolas, lo cual pone en dudas la extrapolación al humano de muchos hallazgos realizados en modelos experimentales.

Además de estas alteraciones mecánicas, se ha descrito el fenómeno denominado *rarefacción vascular* que no es más que la pérdida efectiva de unidades de perfusión microvascular (arteriolas o capilares) dando como resultado una hipoperfusión en varios tejidos, especialmente en el músculo esquelético, riñones y cerebro. La resistencia a la insulina se relaciona directamente con esta hipoperfusión y con la pérdida de la densidad capilar en el músculo esquelético. Como hemos visto en nuestro caso, un porcentaje significativo de pacientes DM2 se ajustaron a un cuadro de síndrome metabólico con resistencia insulínica periférica, pero independientemente de si presentaban o no esta característica, *todos* los pacientes DM2 tratados con insulina mejoraron sus indicadores de disfunción endotelial y lo hicieron aún a pesar de seguir diferentes regímenes de administración de la hormona (en tipo y en posología, ambas cosas elegidas en forma personalizada de acuerdo con la experiencia clínica con cada paciente).

Otro aspecto que estudiamos específicamente es el de emplear la determinación de productos avanzados de glicosilación como biomarcadores de

eficiencia terapéutica en pacientes DM2. Diferentes vías bioquímicas asociadas con la hiperglucemia están implicadas en el aumento de la producción de radicales libres (superóxido  $O_2$ , hidroxilo  $OH$ , etc.) (Halliwell y Gutteridge, 1989). Los ROS se producen excesivamente en este tipo de pacientes en relación directa con la hiperglucemia. La exposición de las células del endotelio a concentraciones elevadas de glucosa, conduce a un aumento de los AGEs que pueden contrarrestar los efectos vasodilatadores del óxido nítrico, y servir de agentes catalíticos para la propagación de las cadenas de radicales libres y especies altamente reactivas incrementando el daño general y la disfunción endotelial subsecuente. Nosotros hemos demostrado una clara correlación entre AGEs y NO, y en este sentido debemos recordar que el óxido nítrico, además de actuar inhibiendo la adhesividad y la agregación plaquetarias y reducir la adherencia de los monocitos a las células del endotelio, es capaz de inhibir la proliferación de células lisas vasculares. De modo que se esperaba un incremento del NO en respuesta (compensatoria si se quiere) de la hiper-producción de AGEs.

Los productos de glicosilación avanzados (AGEs) se acumulan en los tejidos de los pacientes DM2, y específicamente en las paredes arteriales, no solo en relación directa con la glucemia sino también en función del tiempo de evolución clínica. Tal como lo hemos demostrado, esto se cumple en nuestros grupos experimentales y conllevaría al aumento o acumulación de ROS, daño a lípidos insaturados (TBARS), producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL) y modificación de las proteínas de la matriz intercelular (esto último en concordancia con el incremento de los niveles de PCs). En conjunto, los niveles de AGEs, TBARS y PCs elevados reflejaron claramente estos efectos deletéreos. Los tres biomarcadores mencionados son considerados indicadores muy sensibles y tempranos del daño tisular en los pacientes DM2 especialmente en relación con la disfunción renal, la neuritis/vasculitis periférica y el daño a la nefrona (Cvetković et al, 2009; Matheson et al, 2010; Nielsen et al, 2012; Simonson et al, 2012; Fu et al, 2012). Nuestros resultados indicaron que todos ellos fueron substancialmente disminuidos por la administración de insulina agregada a la terapia con hipoglucemiantes.

Hemos comprobado asimismo, que las correlaciones entre estos biomarcadores (como ha sucedido en realidad con todos los que hemos determinado) son menos significativas en los pacientes DM2 tratados con la hormona en comparación con los no tratados. Esto último ya constituye - por si

mismo - una fuerte evidencia experimental a favor del empleo de insulina en pacientes DM2.

Otro mecanismo que vincula la hiperglucemia, la aterosclerosis, y las complicaciones vasculares de la DM2, es la glicosilación no enzimática de las mismas lipoproteínas circulantes. Este quizás sea el principal proceso que relaciona la glicosilación no enzimática con otros que promueven la aterogénesis. Los efectos de los AGEs incluyen entre otros, cambios pro-coagulantes en la superficie de las células endoteliales y mayor estrés oxidativo por su unión a receptores en la superficie de las mismas, mayor permeabilidad endotelial por inhibición de la unión de heparán-sulfato a la matriz extracelular, proliferación de células de músculo liso por inducción de citoquinas (la cual se debe a la unión de proteínas-AGEs a receptores específicos de los macrófagos), mayor secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas, y una acentuación de la quimiotaxis de monocitos sanguíneos.

Asimismo, la LDL *glicosilada* “evade” la detección por los clásicos receptores de LDL de modo que aumenta la síntesis de ésteres de colesterol y la acumulación de macrófagos. De modo que la acumulación de células *espumosas* (formadas por captación de lípidos en los macrófagos), y la proliferación de células de músculo liso están aumentadas por la unión de LDL *glicosilada* a los receptores de macrófagos en la zona del endotelio disfuncional. Se ha demostrado repetidas veces que las LDL de pacientes con DM2 son anómalas con respecto a su carga, grado de glicosilación, composición lipídica, y al tipo de ácidos grasos que se hallan acilados a ellas, y tiene anomalías en la conformación del dominio de unión del receptor de la Apo-B. Si embargo, estos estudios a pesar de ser numerosos son algo discordantes en la importancia relativa que le adjudican a estos cambios (Alvarez, 2006).

No obstante lo dicho, nos resulta sensato suponer que la captura disminuida de las lipoproteínas que contienen Apo-B - por parte del receptor específico - provoca la acumulación de LDL *in vivo*, y puede ser de gran importancia en la patogénesis de la aterosclerosis en los pacientes DM2. Es un hecho consabido que estas LDL pequeñas y densas son mucho más aterogénicas que una cantidad equivalente de LDL grandes y ricas en ésteres de colesterol debido a que las primeras son más susceptibles a la peroxidación y a la penetración y adhesión a las paredes arteriales. Además las LDL glicosiladas son también más peroxidadas, y

ambas condiciones favorecen la inflamación y elevan la concentración local de agregantes.

En varias de las secuencias de las reacciones de Maillard (proteínas-glúcidos) se producen radicales libres y este fenómeno es directamente (y enzimo-independiente) desencadenado por la hiperglucemia. La glicosilación no enzimática también resulta estimulada por el oxígeno y por metales de transición como el hierro y el cobre (Tan et al, 2002). Los AGEs a su vez provocan la oxidación de proteínas de larga vida media afectando a numerosos blancos en muchos tejidos que incluyen al fibrinógeno, el colágeno y a las propias lipoproteínas y sus receptores (Martín-Gallán et al, 2003; Ahmed, 2005; Sathiyapriya et al, 2007). Estos hallazgos han servido de apoyo para que muchos consideren al estrés oxidativo y a los AGEs como los dos mecanismos principales involucrados en la patogénesis de la disfunción endotelial (Tan et al, 2002). De ahí que la determinación de AGEs y simultáneamente de marcadores de estrés oxidativo y de daño pro-oxidativo (TBARS, PCs) sean esenciales en la evaluación de la respuesta del endotelio en pacientes DM2 y que los recomendemos como biomarcadores de gran proyección clínica.

Como venimos comentando, hemos demostrado que en los pacientes DM2 se encontraron incrementados los AGEs al compararlos con los niveles presentes en controles. En estos pacientes, otros autores demostraron que las concentraciones de productos finales de la glicosilación avanzada son altas en los tejidos pero - tal como muestran nuestros resultados - se correlacionaron también con valores elevados en el plasma sanguíneo y este hecho es de resaltar cuando consideramos que su determinación plasmática es mucho más accesible que la tisular.

A modo de resumen diremos que existen tres grandes mecanismos para explicar los efectos de los AGEs en los pacientes DM2: (1) en la matriz extracelular inducen alteraciones estructurales en las proteínas, reducen las uniones de colágeno y heparán-sulfato incrementando el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y favoreciendo la modificación oxidativa de las proteínas estructurales y funcionales, (2) a nivel celular, interactúan con su receptor en células de músculo liso, hígado, endotelio, macrófagos, etc., induciendo algunos factores pro-coagulantes como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina-1 y el factor de crecimiento de la insulina-1, y (3) a nivel intracelular pueden modificar el ADN o inactivar proteínas de cascadas señalizadoras.

Por otro lado, debemos comentar que el nivel de homocisteína en plasma es un muy reconocido marcador de riesgo aterogénico debido a que su incremento en sangre periférica se asocia a irritación endotelial y activación plaquetaria. Tanto la homocisteína como el de tromboxano B-2 (TBX-B2) están íntimamente vinculados desde el punto de vista del desempeño micro- y macrovascular a la biodisponibilidad del factor von Willebrand (FvW) (Tau et al, 2002; Ruiz y Morosini, 2011). El factor von Willebrand (vWf) es una glicoproteína multimérica biosintetizada por las células endoteliales y los megacariocitos que interviene en la adhesión plaquetaria al subendotelio. Los niveles plasmáticos de esta proteína están relacionados con disfunción endotelial en varios desórdenes tanto micro- como macro-vasculares (Morise et al, 1995; Lip y Blann, 1997). El tromboxano A2 de origen plaquetario es uno de los agentes vasoconstrictores más importantes que se halla elevado anormalmente en todos los pacientes DM2, los cuales (además) manifiestan una mayor susceptibilidad del músculo liso a este efector (Alvarez, 2006). Estos parámetros, todos correlacionables con disfunción endotelial, se encontraron notablemente mejorados en los pacientes DM2 con suplementación insulínica de algún tipo.

Discutiremos ahora el importante rol de la adiponectina (AN) dentro del escenario de insulina-resistencia y la diabetes tipo 2.

La adiponectina es una proteína llamada AdipoQ o Acrp30. Es considerada un nuevo e importante miembro de la familia de las *adipocitoquinas* que se sintetiza exclusivamente en el tejido adiposo blanco y es producida durante la diferenciación del adipocito (Berg et al, 2002). Su gen ha sido localizado en el cromosoma 3q27, íntimamente ligado al índice de masa corporal (IMC), donde se encuentra igualmente un locus de susceptibilidad a la DM2 (Takahashi et al, 2005). Tiene como funciones principales estimular la utilización de la glucosa y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, tanto en el hígado como en el músculo, e inhibir *in vitro* la proliferación de las células del músculo liso vascular. También incrementa la fosforilación por tirosina del receptor de la insulina provocando un aumento en la sensibilidad a la hormona (Yamauchi et al, 2001, 2003) que es el paso inicial esencial en la cascada de señalización de la insulina. Diversos investigadores sugieren que la adiponectina es el sensor más ejecutivo que vincula al tejido adiposo con el metabolismo de la glucosa. La administración de esta proteína a ratas obesas o diabéticas reduce los niveles circulantes de ácidos grasos libres por un incremento en la  $\beta$ -oxidación a nivel del músculo esquelético, aumenta la sensibilidad a la



insulina mediante la activación de la quinasa dependiente de cAMP (cAMP-PK), e incrementa la expresión del receptor del proliferador peroxisómico  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) a través del receptor del ácido 9-cis retinoico en músculo esquelético e hígado (Yamauchi et al, 2003).

La AN también favorece significativamente la degradación muscular de ácidos grasos antes que la de glucosa con reducción de su débito hepático (Yamauchi et al, 2001). En general sus efectos básicos la convierten en una proteína que posee acción anti-inflamatoria, anti-diabetogénica, y anti-ateroesclerótica (Ouchi et al, 2001; Kumada et al, 2003).

La circulación de la AN es por vía hemática, atraviesa la barrera hematoencefálica y actúa sobre ciertas neuronas para reducir el apetito y en consecuencia el peso corporal al tiempo que incrementa la tasa metabólica. Su descubrimiento ha demostrado hace ya muchos años que tiene relaciones muy interesantes con la obesidad, la DM2, y la patología cardiovascular (Fitz-Patrick, 1996). Esta proteína se caracteriza porque se une al colágeno tipo I, III, y V, los cuales están presentes en la íntima sub-endotelial. Se acumula en las paredes de los vasos injuriados y es producida por el tejido adiposo viscerο-οmental desde donde luego circula hacia el plasma entrando por vía portal al paso hepático hacia la vía sistémica. Suprime la adhesión molecular en las células endoteliales inducidas por la expresión del TNF- $\alpha$ , la proliferación de las células del músculo liso inducidas por los factores de crecimiento, y la transformación de los macrófagos en células espumosas (Zoccali et al, 2002; Ruiz y Morosini, 2011). Sin embargo, también propicia la producción del inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1 por los macrófagos y de esta forma se cree que podría facilitar la ruptura de la placa ateromatosa (Maeda et al, 2002).

En general, todos los investigadores coinciden en que los niveles altos de AdipoQ (o AN) en la sangre se asocian con bajas lecturas de factores de riesgo cardiovascular, tales como la tensión arterial y el LDL-colesterol, y con altos niveles de HDL-colesterol. Por ello, dicha proteína mejora la sensibilidad a la insulina e incrementa el metabolismo lipídico de manera que funciona como factor anti-aterosclerótico (Kumada et al, 2003). Además, los niveles elevados de AN están asociados al incremento de HDL-colesterol y a una reducción de la inflamación (Kazumi et al, 2003; Kumada et al, 2003). Conjuntamente, estos efectos podrían ayudar a reducir el riesgo de cardiopatía y accidente cerebro vascular (Fitz-Patrick,

1996). En síntesis la AN está asociada a riesgo negativo para el desarrollo de MD2 y aterosclerosis (Kazumi et al, 2002; Kumada et al, 2003; Ohashi et al, 2004).

El rol de la AN en la resistencia insulínica se ha estudiado tanto en humanos como en ratas con lipodistrofia. Después en 1998 caracterizó la lipodistrofia como una pérdida de grasa corporal *selectiva y variable* causada (entre otras cosas) por resistencia insulínica, y probó que en pacientes con resistencia a la insulina / síndrome dislipidémico, los niveles de AN están extremadamente bajos lo cual puede estar relacionado con la ausencia general de tejido adiposo y/o asociado a una severa resistencia insulínica. En contraste con el resto de adipocitoquinas hasta hoy conocidas, la adiponectina está disminuida en la obesidad, DM2, y enfermedad cardiovascular, todas estas condiciones comúnmente asociadas al SiRIns y su expresión se estimula por tratamiento con insulina en animales y humanos (Recasens et al, 2004). Efectivamente, la población de pacientes con DM2 estudiada por nosotros presentó niveles bajos de AN pero estos fueron aún más bajos en sujetos obesos o con marcado síndrome de resistencia insulínica. Nuestro estudio de correlación vinculó positivamente el descenso de AN con el IMC de los pacientes estudiados en todas las sub-poblaciones (sean o no diabéticos) y demostró que el nivel de AN mejora en pacientes suplementados con la hormona.

En 1964 Randle y colaboradores, propusieron que el aumento de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, característico de los pacientes con DM2, restringe el consumo de la glucosa en el músculo por alteración del potencial de óxido-reducción de la célula y por inhibición de varias enzimas de la glicólisis. Cuando los ácidos grasos se oxidan en cantidades aumentadas, hay una acumulación de acetil-CoA en la célula que es un poderoso inhibidor del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Este complejo es activado cuando el piruvato se está utilizando para la formación de acetil-CoA, activación que se produce por desfosforilación de la forma inactiva catalizada por las piruvato fosfatasa I y II las cuales son a su vez estimuladas por altos niveles intracelulares de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  y por la unión de la insulina a sus receptores. El resultado de estos trastornos bioquímicos incluye la inhibición de la utilización de glucosa, incrementándose los ácidos grasos libres y también su  $\beta$ -oxidación. Pero la consecuencia final más notable es la disminución de la expresión y actividad de la lipoproteína-lipasa (LPL) en el adipocito, en virtud de que la insulina es su principal regulador. Esto se traduce en un aumento en la actividad de la lipasa hepática la cual acelera la síntesis y secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad ricas en triglicéridos, con elevación de los triglicéridos plasmáticos,

disminución del HDL-colesterol, modificaciones de la composición de las LDL, incremento de colesterol LDL y de LDL-oxidadas, y acumulación de remanentes de VLDL y de quilomicrones. En conjunto estos factores coadyuvan al establecimiento del cuadro aterogénico en el paciente DM2.

Como un evento central, la situación de estrés oxidativo instaurada en el paciente DM2 conlleva a la peroxidación de los lípidos de las lipoproteínas, especialmente de la LDL, y se sabe que el nivel de Ox-LDL está en relación directa con el daño micro- y macrovascular (Galland et al, 2006). Nuestros resultados demostraron una clara correlación entre la concentración de Ox-LDL y el nivel plasmático de TBARS, lo cual es relevante a la hora de emplear a cualquiera de ambos biomarcadores para evaluar el estado peroxidativo y la cascada de daños antes reseñada en relación a los AGEs.

En virtud de lo antes dicho, nos resultó fundamental enfocar parte de nuestro estudio hacia la búsqueda de biomarcadores que reflejaran la composición de los ácidos grasos en los lípidos tisulares de los pacientes DM2. Pero esta decisión no nos condujo a una elección sencilla. Estudiamos el plasma, los leucocitos y las membranas de eritrocitos (fantasmas) por ser materiales biológicos obtenibles por métodos mínimamente invasivos.

En relación a los ácidos grasos plasmáticos, se sabe fehacientemente que constituyen un vínculo importante entre la obesidad, la resistencia a la insulina, y la DM2 (Alvarez, 2006). Primero, los niveles de AGL se encuentran elevados en la mayoría de los obesos. Segundo, las elevaciones de los niveles de AGL inhiben la entrada de glucosa a las células estimulada por la insulina de manera dosis-dependiente en controles y pacientes DM2. Existen dos mecanismos posibles para explicar este fenómeno: la inhibición del transporte o de la fosforilación de glucosa mediado por los lípidos y la disminución de la actividad de la glucógeno sintasa inducida por los FAs. En los obesos, la resistencia a la insulina a nivel de los adipocitos ocurre en una fase temprana, provocando el incremento de la hidrólisis intracelular de los triglicéridos (TAG) y por consiguiente, la disminución de la internalización de AGL por los adipocitos.

Se conoce que en muchos de los procesos fisiológicos vinculados con el metabolismo de los lípidos y glúcidos, la composición de la bicapa lipídica de las membranas celulares desempeña una función esencial. En nuestro caso, los fantasmas eritrocitarios resultaron ser la mejor opción para evaluar las alteraciones

inducidas por el estado diabético (respecto a los controles) y la eficacia del agregado de insulina al esquema terapéutico como corrector de las anomalías halladas.

Además de la síntesis endógena, la otra fuente de ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas es la dieta. Resulta muy notable que a pesar de las distintas dietas que llevaron los controles y los pacientes DM2, el tratamiento con insulina acercó los valores a los observados en para el grupo control. Este hecho nos sugiere fuertemente que el cúmulo de efectos determinantes de los cambios composicionales es más dependiente de la falta de actividad biológica de la hormona que de la composición específica de la dieta de cada grupo experimental.

Asimismo, es muy bien conocido que las modificaciones de la calidad/cantidad de ácidos grasos acilados a lípidos complejos alteran la fluidez de la membrana y afectan diversas funciones tales como el transporte mediado, las propiedades de ciertas enzimas unidas a membranas, las uniones ligando-receptor (como es el caso de los propios receptores de insulina), fagocitosis, endocitosis, exocitosis dependiente de la despolarización, citotoxicidad inmunológica y quimioterapéutica, producción de prostaglandinas, y crecimiento celular. También se sabe desde hace muchos años que los cambios en las membranas celulares debido a las alteraciones en su composición de ácidos grasos pueden disminuir lo que Spector denominó la "accesibilidad" de la insulina a su receptor (Spector, 1985).

Por otro lado, la asociación entre la acumulación de lípidos, la alteración de los ácidos grasos libres, la producción de AGEs, y la resistencia a la insulina está bien establecida. Estudios de la resistencia a la insulina en DM2, obesidad, animales alimentados con dietas grasas, y células tratadas con lípidos han permitido la identificación de defectos a nivel de la autofosforilación del receptor en los residuos de tirosina (Tyr) por parte de la tirosina quinasa intrínseca que está ubicada en las subunidades citosólicas de este. Una sola molécula de insulina es capaz de modificar la estructura dimérica del receptor y activar la tirosina quinasa intrínseca. El defecto a este nivel consiste en la fosforilación de los residuos de serina (Ser) y de treonina (Thr) del receptor de insulina en lugar de la fosforilación de los residuos de Tyr. También se ha observado la inhibición directa de determinados componentes como la proteína quinasa B (PKB) la cual está influenciada por el tipo de ácidos grasos acilados a los lípidos complejos de la bicapa en la membrana (Ginsberg y Huang, 2000; Schmitz-Peiffer, 2000; Alvarez, 2006).

De modo que el rol de los FAs en las bicapas lipídicas no es una cuestión menor. Se conoce exhaustivamente que las moléculas participantes en el

mecanismo de señalización de lípidos pueden ser varias e incluyen a los mismos FAs y al diacilglicerol, el cual activa a las isoenzimas de la familia de la proteína-quinasa C (PKC), la ceramida (que posee varios efectores incluyendo a las PKCs y varias proteína fosfatasa), etc. Adicionalmente, la sobrecarga de lípidos puede influenciar el flujo a través de la ruta de biosíntesis de las hexosaminas, lo cual provocaría la activación de PKC al igual que la glicosilación de las proteínas y la modulación (activación selectiva) de la expresión genética (Ginsberg, 2000; Schmitz-Peiffer, 2000).

En relación con lo antes dicho mencionaremos también que los ácidos grasos como componentes de las células endoteliales tienen un papel central tanto en el suministro de precursores para la síntesis de tromboxanos, prostaciclina y prostaglandinas, como en la regulación de los procesos de membrana involucrados en el tráfico del colesterol y en el metabolismo lipoproteico en general. Se sabe además, que los ácidos grasos homólogos de la serie n-3 son anti-inflamatorios y antiagregantes plaquetarios (lo opuesto a los derivados de la serie del linoleico o n-6) (Schmitz y Eckert, 2008; Hurtado de Catalfo et al, 2009) de ahí la importancia de contar con un marcador confiable de su estatus en los pacientes con DM2.

Habiendo ya comentado los principales aspectos de cada uno de los biomarcadores estudiados, y en virtud de todo lo antes dicho, la discusión se enfoca ahora hacia dos cuestiones centrales:

- (a) Siendo que la insulina es una hormona lipogénica por excelencia, ¿no sería su administración contraproducente en pacientes diabéticos de tipo 2?
- (b) ¿Porqué en pacientes hiperglucémicos (como la mayoría de los DM2) la suplementación con insulina “exógena” resultaría *a priori* beneficiosa?

Para abordar la primera de estas dos cuestiones principales sería prudente (aunque quizás innecesario) recordar la vinculación entre insulina y aterogénesis. Existe una clara relación entre la disminución de la sensibilidad a la acción de la insulina, el hiperinsulinismo secundario, y la predisposición a la aterosclerosis. Los niveles elevados de insulina se relacionan con concentraciones elevadas de PAI-1 (inhibidor del plasminógeno tipo 1) debido a una aparente acción *directa* de la insulina sobre los hepatocitos que lo sintetizan (Alvarez, 2006). El PAI-1 se correlaciona directamente con la concentración plasmática de triglicéridos en los pacientes con cardiopatía isquémica, además de encontrarse en altas

concentraciones en la placa de ateroma (Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011). De manera general, la resistencia a la insulina puede definirse como una disminución de la respuesta (o de la sensibilidad) de los efectores a la acción de esta hormona en los tejidos periféricos. Los efectores de la insulina incluyen principalmente a las células musculares, los adipocitos, los hepatocitos, y las mismas células  $\beta$  de los islotes pancreáticos. La resistencia insulínica puede ser clasificada en (1) disminución de la sensibilidad a la hormona (el mal denominado *defecto pre-receptor*), (2) respuesta biológica disminuida a la insulina (*defecto post-receptor*), y (3) disminución mixta de la sensibilidad y de la respuesta. La consecuencia inmediata de la insulino-resistencia es el incremento compensador de la secreción de la hormona por las células  $\beta$ , produciéndose el hiperinsulinismo (sin que las concentraciones elevadas de insulina se acompañen de hipoglucemia).

La insulina actúa, como es bien sabido, en diferentes procesos del catabolismo lipídico. Se ha demostrado fehacientemente que la menor eficacia insulínica conlleva a una mayor proporción de partículas LDL-glicosiladas que son fuertemente aterogénicas y promotoras de la formación de las células espumosas (Ruiz y Morosini, 2011). También la insulina aumenta el número y actividad de los receptores celulares de LDL, estimula a la HMG-CoA reductasa y modula la actividad de lecitín-colesterol acil-transferasa (LCAT). Como una clásica hormona anabólica, tiene una alta actividad biosintética en el tejido adiposo promoviendo el almacenamiento de los triglicéridos por diversos mecanismos. Uno de ellos es inducir la expresión de lipoproteinlipasa unida a células endoteliales vasculares del tejido adiposo, lo cual conduce a la hidrólisis de triglicéridos de las lipoproteínas circulantes, aumenta el transporte de glucosa dentro del adipocito, incrementa la utilización del  $\alpha$ -glicerol fosfato en la esterificación de ácidos grasos libres, e inhibe la lipólisis intracelular.

El hiperinsulinismo además, eleva la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), causando hipertrigliceridemia (esto se ve sobre todo cuando la resistencia a la insulina reduce la remoción de triglicéridos). A esto hay que agregar que la hiperinsulinemia - al menos en el sexo masculino - puede disminuir los niveles de dehidroepiandrosterona (DHEA). Recientemente se ha comprobado que en esta situación metabólica se inhibe la degradación proteica en el miocardio, lo cual se constituye en un mecanismo antiproteolítico (potencial) a través del cual la hiperinsulinemia contribuye al desarrollo de la hipertrofia miocárdica en pacientes DM2 (Ruiz y Morosini, 2011).

También se sabe desde hace muchos años que el receptor denominado "AT1" media muchos de los efectos biológicos del sistema renina-angiotensina tales como la vasoconstricción y la proliferación celular. La hiperinsulinemia induce un alto nivel de expresión de los receptores AT1 lo cual potencia la eficiencia biológica de la angiotensina II (Nickening y Bohm, 1998; Nickening et al, 1998). La regulación heteróloga del receptor AT1 inducida por la insulina a través de mecanismos post-transcripcionales podría explicar la asociación entre la hiperinsulinemia, la hipertensión y la aterosclerosis debido a que la activación de dicho receptor desempeña una función importante en la regulación de la presión y homeostasis sanguínea (Nickening et al, 1998). En nuestro estudio los pacientes tratados con insulina no mostraron, sin embargo, mayores valores de presión arterial (sistólica y/o diastólica) que la subpoblación sin suplementación con la hormona. No obstante, y considerando los aspectos metabólicos antes comentados, parecería que la administración de insulina conllevaría un riesgo de aumento de aterogénesis. Pero nuestros resultados indican que solamente se modifican negativamente el marcador convencional trigliciridemia en sangre periférica, sin cambios substanciales en los otros parámetros respecto a los pacientes DM2 que reciben solo terapia a base de HO. Es más, los biomarcadores no convencionales o emergentes (excepto el fibrinógeno) demostraron lo contrario: un efecto protector que acerca el grupo de riesgo a los valores control. Aún en el caso del fibrinógeno (en donde no observamos disminución al suplementar con insulina) si demostramos que su acumulación es menor en pacientes tratados que no tratados con la hormona en función del tiempo de evolución clínica. Por otro lado, que el nivel de fibrinógeno plasmático no se modificara significativamente en relación al subgrupo tratado sin insulina, podría indicar que el probable efecto inductor de la hormona sobre el inhibidor de plasminógeno (PAI-1) (Alvarez, 2006) tampoco sería muy significativo. El estudio de correlación entre los marcadores mencionados y el nivel plasmático de insulina mostró que *solo en los pacientes con elevada concentración de hormona* hay un efecto negativo sobre los valores de triglicéridos.

En cuanto a la segunda cuestión, otra vez debemos recurrir a nuestros resultados de correlación de valores de biomarcadores y grado de hiperinsulinismo. Por un lado debemos recordar que el efecto beneficioso de la hormona sobre la mayoría de los factores pro-aterogénicos (VCAM-1, TBX-B2, TNF $\alpha$ , etc) resultó independiente del tipo de insulina empleada y del nivel plasmático de partida (aunque en menor escala, fue beneficioso aún en aquellos casos de pacientes con

notable hiperinsulinemia). En segundo lugar la hormona ejerce múltiples efectos regulatorios sobre el metabolismo de lípidos, distintos a los pro-aterogénicos antes comentados y que involucran especialmente a los ácidos grasos, que podrían alejar al paciente del riesgo aterogénico. Por ejemplo, se sabe que la insulina es activadora de la biosíntesis de ácidos grasos polinosaturados por regulación positiva de las desaturasas microsomales (Brenner, 2003). De modo que un mayor nivel de VLDL o de triglicéridos podría no ser tan perjudicial como se supone si consideramos que bajo tratamiento con insulina tendrían una composición de ácidos grasos mas saludable, el plasma en su conjunto sería menos pro-agregante y menos pro-inflamatorio, y simultáneamente la hormona aplacaría el estado de estrés oxidativo (con descenso de TBARS) que caracteriza a la enfermedad. Todos estos comentarios se hallan respaldados por nuestros resultados (caída en los marcadores de agregación/adhesión, disminución del TBX-B2, PCs, TBARS, y cambios substanciales en la composición de los lípidos de plasma, leucocitos y membranas eritrocitarias con notable incremento del índice de insaturación).

Consideremos también la cuestión central de evaluar los datos de colesterol ligado a lipoproteínas en forma *aislada*. La administración de insulina actúa beneficiosamente en el *cociente* colesterol total/colesterol-HDL, efecto que bien podría estar mediado por la estimulación de la adiponectina que se sabe que propicia este cambio favorable (ya comentado antes) además de funcionar como un antiinflamatorio *per se* (Alvarez, 2006; Ruiz y Morosini, 2011).

En suma, los efectos de la insulina no se pueden adjudicar a un mecanismo *puntual* porque resultan de la superposición de múltiples efectos, muchos de los cuales no hemos explorado o directamente desconocemos. Existe, tal como ya lo comentamos, un cúmulo de evidencia de tipo fenomenológica que apoya la suplementación con la hormona en los regimenes de hipoglucemiantes orales convencionalmente utilizados (Blicklé et al, 2009; Ametov et al, 2010; Porcellatti et al, 2011). Sin embargo, no nos consta que exista aún un cúmulo de evidencias que detallen los mecanismos beneficiosos subyacentes a esta administración, los cuales parecen ser muy complejos de abordar.

De modo que nuestro aporte, por un lado se enrola dentro de la evidencia fenomenológica antes citada, y por otro lado, funciona como un conocimiento *generador de hipótesis de trabajo* que deberían ser exhaustivamente abordadas a fin de esclarecer los aspectos más íntimos de su funcionamiento.



## Conclusiones

---

*"A medida que la fogata del conocimiento científico  
se hace más brillante,  
más queda expuesta la enorme oscuridad  
en la que estamos sumidos".  
- Terence Mc Kenna*

## 7.- Conclusiones

Queda claro que los efectos de la insulina son tan complejos, interrelacionados y diversos que es muy difícil explicar el cambio final observado en nuestros pacientes DM2 tras la administración de la hormona. Esto se agrava por la falta de estudios previos de este tipo de problemática desde una perspectiva mecanística.

Por un lado la hormona podría ejercer efectos pro-aterogénicos, pero por otro sus actividades directa o indirectamente anti-aterogénicas se hacen prevalentes y el resultado final resulta ser protectoro. Esta conclusión debe ser necesariamente acompañada de una consideración especial sobre el nivel de hiperinsulinismo y resistencia periférica a la hormona que exhiba el paciente. La suplementación estaría indicada cuando el nivel de insulina circulante no es excesivo o en términos más sencillos cuando los marcadores convencionales superen ciertos valores de referencia que aún no han sido investigados (por ejemplo Hb A<sub>1c</sub> ≥ 7 %). De modo que se requieren estudios más exhaustivos y con un mayor *n* para decidir cual sería la línea de corte y la condición de hiper-insulinismo que desacosejarían su implementación.

En general, podemos decir que la administración de insulina en combinación con hipoglucemiantes orales modifica significativamente y de manera beneficiosa a todos los biomarcadores de inflamación, y a la mayoría de los marcadores de riesgo aterogénico y disfunción endotelial. Estos efectos son independientes del tipo de insulina administrada, pero correlacionan con otras variables sustentando la idea de obtener un beneficio tras su administración. Existe una clara dependencia entre el deterioro evaluado por cualquiera de los marcadores y el tiempo de evolución clínica, y una compleja inter-relación entre ellos que se ve mejorada por efecto de la hormona siempre y cuando se considere exceptuar a los pacientes con muy significativa hiperinsulinemia.

Los resultados apoyan la implementación de una terapia combinada de hipoglucemiantes orales e insulina como una mejor opción para disminuir las complicaciones de la DM2, siempre que se tomen los recaudos pertinentes para evitar el riesgo de hipoglucemia (sobre todo en pacientes susceptibles). Asimismo, podría favorecer una mayor expectativa funcional de las células  $\beta$  que de este modo no se verían tempranamente *agotadas* para acometer con la demanda creciente de insulina a nivel periférico.

Se justificaría ampliar este tipo de investigaciones longitudinales a grandes poblaciones de pacientes DM2 cuidadosamente seleccionadas a fin de rectificar o ratificar estos hallazgos como *generadores de hipótesis de trabajo*, las cuales conducirían finalmente a una descripción mecanística clara sobre los eventos sobre los cuales se sustentan.

Tras la dilucidación de estas cuestiones podría ser posible entonces admitir su inclusión como un protocolo o una recomendación farmacológica sentada sobre bases mucho más convincentes.

## Referencias bibliográficas

---

*"Si con estas ideas he podido ver algo mas lejos,  
es porque me he parado sobre los hombros de gigantes"*  
*- Isaac Newton -*

## 8.- Referencias bibliográficas

### A

Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA. (2011) Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 21: B1-B15.

Accinni R, Rosina M, Bamonti F, Della Noce C, Tonini A, Bernacchi F, Campolo J, Caruso R, Novembrino C, Gherzi L, Lonati S, Grossi S, Ippolito S, Lorenzano E, Ciani A, Gorini M. (2006) Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. *Nutr. Metab. Cardiovas. Dis.* 16: 121-127.

Ahmed N (2005) Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 67: 3-21.

Alaupovic P, Bard JM, Tavella M, Shafer D. (1992) Identification of apoB containing lipoprotein families in NIDDM. *Diabetes.* 41(Suppl 2): 18-25.

Alvarez CCA. (2006) Diabetes mellitus y aterosclerosis. Editorial EUDEBA, Buenos Aires.

American Diabetes Association (2002). Position Statement: evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Am. Diab. Assoc.* 102: 109-118.

Ametov AS, Kochergina II, Ulanova KA. (2010) Effect of insulin therapy on insulin resistance and risk for ischemic heart disease and death from cardiovascular pathology in patients with diabetes mellitus, type 2. *Ter. Arkh.* 82: 42-46.

Andrew PJ, Mayer B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43: 521-531.

ASH. (American Society of Hypertension). (1998) Hypertension: epidemiology, risk factors and complications. New York: American Society of Hipertension; Pags. 13-16.

### B

Badinón L, Martíne-González J. (2006) Disfunción endotelial. *Rev. Esp. Cardiol.* (Supl.) 6: 21A-30A.

Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, Castro Cabezas M, Chapman MJ, Couture P (2005) Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *J. Internal. Med.* 259: 247-258.

- Baynes C, Henderson AD, Anyaoku V. (1991) The role of insulin insensitivity and hepatic lipase in the dyslipidemia of type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 8: 560-566.
- Benzie IFF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 238: 70-76.
- Berg A., Combs T., Scherer P. (2002). Acrp30/adiponectin: an adipocytokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metabolism.* 13: 84-89.
- Berlett BS, Stadtman ER. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316.
- Berlin E, Bhathena SJ, Judd JT, Nair PP, Jones DY, Taylor HR (1989) Dietary fat and hormonal effects on erythrocyte membrane fluidity and lipid composition in adult women. *Metabolism* 8: 790-796.
- Bhooshan Pandey K, Mishra N, Rizvi SI. (2010) Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem.* 43: 508-511
- Blicklé JF, Hancu N, Piletic M, Profozic V, Shestakova M, Dain MP, Jacqueminet S, Grimaldi A. (2009) Insulin glargine provides greater improvements in glycaemic control vs. intensifying lifestyle management for people with type 2 diabetes treated with OADs and 7-8 % A1c levels. The TULIP study. *Diabetes Obes. Metab.* 11:379-86.
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brenner RR. (2003) Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 68: 151-162.
- Brenner RR, Rimoldi OJ, Lombardo YB, González MS, Bernasconi AM, Chicco A, Basabe JC. (2003) Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet. *Lipids.* 38: 733-742.
- Brown JB, Pedula KL, Bakst AW. (1999) The progressive cost of complications in type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med.* 159: 1873-80.
- Buckley R, Shewring B, Turner R, Yaqoob P, Minihane AM. (2004) Circulating triacylglycerol and apoE levels in response to EPA and docosahexaenoic acid supplementation in adult human subjects. *Br J Nutr.* 92: 477-483.

**C**

- Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. (2004) Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*. 109 (Suppl III):2-7.
- Ceron JJ, Martinez Subiela S. (2004). An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Veterinary Res*. 35: 671-679.
- Chait A, Wight TN. (2000) Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix. *Curr Opin. Lipidol*. 11: 451-456.
- Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. (2011) Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress, and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diab. Res. Clin. Practice* 93: 53-62.
- Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. (1998) Atherogenic, dense low-density lipoproteins: pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur. Heart. J*. 19 (Suppl A):A24-A30.
- Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. (2000) Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*. 33 Suppl: S99-S108.
- Chonchol M, Katz R, Fried LF, Sarnak MJ, Siscovick DS, Newman AB, Stromeyer ES, Bertoni A, Shlipak MG. (2010) Glycosylated haemoglobin and the risk of death and cardiovascular mortality in the elderly. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. 20: 15-21.
- Chowienzyk PJ, Brett SE, Gopaul D, Marchetti M, Russell-Jones DL, Anggard EE, Ritter JM. (2000) Oral treatment with an antioxidant (raxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type II diabetes. *Diabetologia* 43: 974-977.
- Cines DB, Polak ES, Buck CA. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-61.
- Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ. (2004). Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiol. Res*. 64: 172-178.
- Clifton P, Nestel P. (1998) Effect of dietary cholesterol on postprandial lipoproteins in three phenotypic groups. *Am. J. Clin. Nutr*. 64: 361-367.
- Cosentino F, Luscher TF. (1998) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc. Pharmacol*. 32 (Suppl 3): S54-S61.
- Cvetković T, Mitić B, Lazarević G, Vlahović P, Antić S, Stefanović V. (2009) Oxidative stress parameters as possible urine markers in patients with diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*. 23: 337-342.

Cowburn PJ, Cleland JGF. (2001) Endothelin antagonists for chronic heart failure: do they have a role? *Eur. Heart J.* 22: 1772-1784.

## D

Dailey G. (2011) Overall mortality in diabetes mellitus: where do we stand today? *Diabetes Technol Ther.* 13:S65-S74.

Dallongeville JMA, Cottel D, Fruchart JC, Amouyel P, Helbecque N. (2001) Polymorphisms in the insulin response element of APOC-III gene promoter influence the correlation between insulin and triglycerides or triglyceride-rich lipoproteins in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25: 1012-1017.

Das UN, Repositi G, Dain A, Eynard AR. (2011) L-arginine, NO and asymmetrical dimethylarginine in hypertension and type 2 diabetes. *Front. Biosci.* 16: 13-20.

De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 130: 963-974.

Despres JP, Verdon MF, Moorjani S, Pouliot MC, Nadeau A, Bouchard C. (1993) Apolipoprotein E polymorphism modifies relation of hyperinsulinemia to hypertriglyceridemia. *Diabetes.* 42: 1474-1481.

Despres JP. (1998). The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. *Obes. Res.* 6 (Suppl.): 8S–17S.

Duc Son NTL, Miles R, Savage PJ, Cornell E, Tracy RP, Knowler WC, Krakoff J. (2008) The association of plasma fibrinogen concentration with diabetic microvascular complications in young adults with early-onset of type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Practice* 82: 317-323.

Duvillard L, Florentin E, Lizard G. (2003) Cell surface expression of LDL receptors is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. *Diabetes Care* 26: 1540-1544.

## E

Eckel RH. (1989) Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.* 320: 1060-1068.

## F

Fitz-Patrick, D. (1996). Diabetes and Hormone Center of the Pacific. *Diabetes.* Disponible en: <http://www.endocrinologist.com/espanol/diabetes.htm>



Folch J, Lees M, Sloane Stanley GA. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.

Fu WJ, Li BL, Wang SB, Chen ML, Deng RT, Ye CQ, Liu L, Fang AJ, Xiong SL, Wen S, Tang HH, Chen ZX, Huang ZH, Peng LF, Zheng L, Wang Q. (2012) Changes of the tubular markers in type 2 diabetes mellitus with glomerular hyperfiltration. *Diabetes Res Clin Pract.* 95: 105-109.

## G

Galland F, Duvillard L, Petit JM, Lagrost L, Vaillant G, Brun JM, Gambert P, Vergès B. (2006) Effect of insulin treatment on plasma oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab.* 32: 625-631.

Garcia-Medina JJ, Pinazo-Duran MD, Garcia-Medina M, Zanon-Moreno V, Pons-Vazquez S. (2011) A 5-year follow-up of antioxidant supplementation in type 2 diabetic retinopathy. *Eur. J. Ophthalmol.* 21: 637-643.

Garg SK, Ulrich H. (2006) Achieving goal glycosylated haemoglobin levels in type 2 diabetes mellitus: practical strategies for success with insulin therapy. *Insulin* 1: 109-121.

Gazzaruso C, Coppola A, Montalcini T, Baffero E, Garzaniti A, Pelissero G, Collaviti S, Grugnetti A, Gallotti P, Pujia A, Solerte SB, Giustina A. (2012) Lipoprotein(a) and homocysteine as genetic risk factors for vascular and neuropathic diabetic foot in type 2 diabetes mellitus. *Endocrine.*41:89-95.

Gerstein HC, Riddle MC, Kendall DM, Cohen RM, Goland R, Feinglos MN, Kira JK, Hamilton BP, Ismael-Beigi F, Feeney P. (2007) Glicemia treatment strategies in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *Am. J. Cardiol.* 99: 34i-43i.

Goh YK, Jumpson JA, Ryan EA, Clandinin MT. (1997) Effect of omega 3 fatty acid on plasma lipids, cholesterol and lipoprotein fatty acid content in NIDDM patients. *Diabetologia.* 40: 45-52.

Ginsberg HN, Huang LS. (2000) The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk.* 7: 325-331.

Glorian M, Limon I. (2007). L'athérosclérose, une maladie inflammatoire. *Rev. Fran. Lab.* 389: 43-48.

Golbidi S, Ebadi SA, Laher I. (2011) Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 7: 106-125.

Gómez M, Valle V, Arós F, Sanz G, Sala J, Fiol M, Bruguera J, Elousa R, Molina L, Martí H, Covas MI, Rodríguez-Llorán A, Fitó M, Suárez-Pinilla MA, Amenazaga R, Marrugat J (en nombre del grupo de Investigadores FORTIAM) (2009) *Rev. Esp. Cardiol.* 62: 373-382.

González-Rodríguez DC, Lisetti SR, González-Martínez JC. (2009) Adiponectina, insulina y glicemia, en individuos con sobrepeso u obesidad sometidos a un régimen de alimentación rico en carbohidratos complejos. *Arch. Latinoam. Nutr.* 59: 296-303.

González M, Rojas N, Duran D. (2007) Respuesta inmune contra las lipoproteínas de baja densidad modificadas en pacientes con diabetes mellitus no-insulino dependiente. *Rev. Med. Chile* 125: 879-885.

Gray RS, Robbins DC, Wang W, Yeh JL, Fabsitz RR, Cowan LD. (1997) Relation of LDL size to insulin resistance syndrome and coronary heart disease in American Indians. The Strong Heart Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 2713-2720.

## H

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. 2nd. ed. Oxford, Clarendon.

Hartland AJ, Smith JM, Dumne F (2000). Correcting serum fructosamine concentration for total protein or albumin concentration is not appropriate during Asian pregnancy. *Clin. Chim. Acta* 292: 175-180.

Haynes WG, Webb DJ. (1993) The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin. Sci.* 84: 485-500.

Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M. (2010) Endothelial dysfunction and aging: an update. *Aging Res. Rev.* 9: 142-152.

Hiukka A, Fruchart-Najib J, Leinonen E, Hilden H, Fruchart JC, Taskinen M-R. (2005) Alterations of lipids and apolipoprotein CIII in very low density lipoprotein subspecies in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 48: 1207-1215.

Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ. (1998) Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 14: 241-249.

Hopfner RL, Gopalakrishnan V. (1999) Endothelin: Emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* 42: 1383- 1394.

Huang ES, Liu JY, Moffet HH, John PM, Karter AJ. (2011) Glycemic control, complications, and death in older diabetic patients: the diabetes and aging study. *Diabetes Care* 34: 1329-1336.

Hurtado de Catalfo GE, Alaniz MJT de, Marra CA. (2009). Influence of comercial dietary oils on lipid composition and testosterone production in interstitial cells isolated from rat testis. *Lipids*, 44: 345-357.

## I

Imrie H, Abbas A, Kearnmey M. (2010) Insulin resistance, lipotoxicity and endothelial dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 320-326.

Irala J, Martíne-González MA, Guillén-Grima F (2001) ¿Qué es una variable de confusión?. *Med. Clin.* 117: 377-385.

## J

Jarret RJ, Viberti GC, Argyropoulos A. (1984) Microalbuminuria predicts mortality in non-insulin-dependet diabetes. *Diabetes Med.* 1: 17-20.

## K

Kadoglou NP, Fotiadis G, Athanasiadou Z, Vitta I, Lampropoulos S, Vrabas IS. (2012) The effects of resistance training on ApoB/ApoA-I ratio, Lp(a) and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *Endocrine*.42: 561-569.

Kalogeropoulos N, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Rousinou G, Toutouza M, Stefanadis C. (2010) Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clin Chim Acta.* 411: 584-591

Kaur S, Singh P, Indu V, Singla G. (2012) Fibrinogen, Lp(a), Microalbuminuria and Left Ventricular Mass Index: Cardiovascular Disease Risk factors in Diabetes. *Indian J Clin Biochem.* 27: 94-96.

Kapitza C, Zijlstra E, Heinemann L, Castelli MC, Riley G, Heise T. (2010) Oral insulin: a comparison with subcutaneous regular human insulin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 33: 1288-1290.

Kazumi T, Kawaguchi A, Sakai K, Hirano T, Yoshino G (2002) Young men with high normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure. *Diabetes Care* (25): 971-976.

Kelley DS, Adkins Y, Woodhouse LR, Swislocki A, Mackey BE, Siegel D. (2011) Docosahexaenoic acid supplementation improved lipocentric but not glucocentric

markers of insulin sensitivity in hypertriglyceridemic men. *Metab Syndr Relat Disord*. PMID: 21999398 (ahead of print).

Kerr D, Olateju T. (2011) Using insulin in type 2 diabetes: in need of a renaissance? *J. Diabetes Sci. Technol.* 5: 829-833.

Khan BU, Parthasarathy SS, Alexander RW. (1995) Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1-gene expression in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 95: 1262-1270.

Khera AV, Cuchel M, Llera-Moya M, Amrith Rodrigues MS, Burke MF, Kashif Jafri BA, French BC, Phillips JA, Mucksavage ML, Wilensky RL, Mohler ER, Rothblat GH, Rader DJ (2011) Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *New Engl. J. Med.* 364: 127-135.

King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes 1995-2015: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21: 1414-1431.

Kobata A, Kotani T, Komatsu Y, Amagase K, Kato S, Takeuchi K. (2007). Dual action of nitric oxide in the pathogenesis of ischemia/reperfusion-induced mucosal injury in mouse stomach. *Digestion.* 75: 188-197.

Kohen Avramoglu R, Basciano H, Adeli K (2006) Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin. Chim. Acta* 368: 1-19.

Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K, Klimek K, Olczyk K. (2012) Plasma biomarkers of oxidative and AGE-mediated damage of proteins and glycosaminoglycans during healthy ageing: a possible association with ECM metabolism. *Mech Ageing Dev.* 133: 538-548.

Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N. (2003.) Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 9: 823-859

## L

Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. (1999) HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin. Chem. Acta.* 286: 145-161.

Lee KW, Blann AD, Lip GY. (2006) Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on plasma indices of thrombogenesis and inflammation in patients post-myocardial infarction. *Thromb Res.* 118: 305-312.

Lee S-J, Moye LA, Campos H, Williams GH, Sacks FM. (2003) Hypertriglyceridemia but no diabetes status is associated with VLDL containing apolipoprotein CIII in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 167: 293-302.

Levin ER. (1995) Endothelins. *N. Engl. J. Med.* 333: 356-363.

Lewis GF, Steiner G. (1996) Hypertriglyceridemia and its metabolic consequences as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet. Metab. Rev.* 12: 37-56.

Lip G, Blann A. (1997) Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc. Res.* 34: 255-265.

## **M**

Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8: 770-731.

Maia-Fernandes T, Roncon-Albuquerque R Jr, Leite-Moreira AF. (2008) Cardiovascular actions of adiponectin: pathophysiological implications. *Rev Port Cardiol.* 27:1431-1449.

Marcoux C, Tremblay M, Fredenrich A, Davignon J, Cohn JS. (2001) Lipoprotein distribution of apolipoprotein C-III and its relationship to the presence in plasma of triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Metabolism.* 50:112-119.

Margetis PI, Antonelou MH, Petropoulos IK, Margaritis LH, Papassideri IS. (2009) Increased protein carbonylation of red blood cell membrane in diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol.* 87: 76-82.

Marks RJ, Raskin P. (1998) Nefropatía e hipertensión en la diabetes. *Clin. Med. Norteam.* 42: 817-843.

Marra CA, Mangioni JO, Tavella M, Alaniz MJT de, Ortiz D, Sala C. (1998) Hormonal-induced changes on the lipid composition and DPH fluorescence anisotropy of erythrocyte ghost from pre- and postmenopausal women. *Acta Physiol. Pharmacol. Toxicol. Lationam.* 48: 8-17.

Martín-Gallán P., Carrascosa A., Gussinyé M., Domínguez C. (2003) Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Rad. Biol. Med.* 34: 1563-1574.

Mas E, Croft KD, Zahra P, Barden A, Mori TA. (2012) Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. *Clin Chem.* 58: 1476-1484.

Masuda H, Azuma H.(2002) Biological and pathophysiological roles of endogenous methylarginines as inhibitors of nitric oxide synthase. *Nippon Yakurigaku Zassi* 119: 29-38.

- Matheson A, Willcox MD, Flanagan J, Walsh BJ. (2010) Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev.* 26: 150-171
- Mattar M, Obeid O. (2009) Fish oil and the management of hypertriglyceridemia. *Nutr Health.* 20: 41-49.
- Mayer B, Hemmens B. (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* 22: 477-481.
- Mazzucco S, Agostini F, Biolo G. (2010) Inactivity-mediated insulin resistance is associated with upregulated pro-inflammatory fatty acids in human cell membranes. *Clin Nutr.* 29: 386-390.
- McLean JW, Tomlinson JE, Luang WJ. (2004) cDNA sequences of human apolipoprotein (a) assembly and pathogenicity. *Curr. Opin. Lipidol.* 15: 167-174.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 5: 62-71.
- Mishima Y, Kuyama A, Tada A, Takahashi K, Ishioka T, Kibata M. (2011) Relationship between serum tumor necrosis factor- $\alpha$  and insulin resistance on obese men with type 2 diabetes mellitus. *Diab. Res. Clin. Pract.* 52: 119-123.
- Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. (2011) Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 65: 1005-1015.
- Moncada S, Higgs A. (2002) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 27: 2002-2011.
- Montanaro MA, Rimoldi OJ, Igal RA, Montenegro S, Tarrés MC, Martínez SM, Brenner RR. (2003) Hepatic delta9, delta6, and delta5 desaturations in non-insulin-dependent diabetes mellitus eSS rats. *Lipids.* 38: 827-832.
- Montanaro MA, González MS, Bernasconi AM, Brenner RR (2007) Role of liver X receptor, insulin and peroxisome proliferator activated receptor alpha on in vivo desaturase modulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids.* 42: 197-210.
- Moore W, Fredrickson D, Brenner A, Childs B, Tatpati O, Hoffman JM. (1998) Prevalence of hypertension in patients with type II diabetes in referral versus primary care clinics. *J. Diabetes Complic.* 12: 302-306.
- Morgensen CI. (1987) Microalbuminuria as predictor of clinical diabetes nephropathy. *Kidney Int.* 31: 673-680.
- Mori Y. (2010) Exploring an optimal approach to the use of oral hypoglycemic agents based on CGM results: implications for combination therapy with oral hypoglycemic agents. *Nihon. Rinsho.* 69: 1505-1514.

Morise T, Takeuchi Y, Kawano M, Koni I, Takeda R. (1995) Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von Willebrand factor in NIDDM patients. *Diabetes Care* 18: 87-89.

Morrison WR, Smith LM. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5: 600-608.

Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. (2008) An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37: 685-711.

## **N**

Naseem KM. (2005). The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects Med.* 26: 33-65.

Nickenig G, Bohm M. (1998) Interaction between insulin and ATI receptor. Relevance for hypertension and arteriosclerosis. *Basic Res. Cardiol.* 93: 135-139.

Nickenig G, Rolin J, Strehlow K, Schnabel P, Bohm M. (1998) Insulin induces upregulation of vascular ATI receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 98: 2453-1460.

NIH. National Institutes of Health. (1995) *Diabetes in America*, vol. (NIH publ. no. 95-1468), 2nd ed. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; Apr., 1995.

Nielsen SE, Reinhard H, Zdunek D, Hess G, Gutiérrez OM, Wolf M, Parving HH, Jacobsen PK, Rossing P. (2012) Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 97: 71-76.

Niranjan TG, Krishnakantha TP. (2000) Membrane changes in rat erythrocyte ghosts on ghee feeding. *Mol Cell Biochem.* 204: 57-63.

## **O**

Ohashi, K., Ouchi, N., Kihara, S. (2004). Adiponectin I164T mutation is associated with the Metabolic Syndrome and coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43: 1195-2000.

Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, L (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* (103):1057-1063.

Ouviña SM, Palmer L, Sasetti B. (2004) Endotelina-1, óxido nítrico y factor von Willebrand en pacientes hipertensos diabéticos de tipo 2. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 38: 471-476.

## **P**

Palacka P, Kucharska J, Murin J, Dostalova K, Okkelova A, Cizova M, Waczulikova I, Moricova S, Gvozdjakova A. (2010) Complementary therapy in diabetic patients with chronic complications: a pilot study. *Bratisl. Lek. Listy.* 111: 205-211.

Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. (1999) Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 43: 509-520.

Pederson O. Genetics of insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107:113-118.

Peters AL. (2008) Clinical relevance of non-HDL cholesterol in patients with diabetes. *Clin. Diab.* 26: 3-7.

Pogatsa G. (1999) From type 2 diabetes to metabolic X syndrome. *Ory. Hetil.* 140: 635-640.

Porcellati F, Bolli GB, Fanelli CG. (2011). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of basal insulins. *Diabetes Technol. Ther.* 13: S15-S24.

Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. (2001) Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta.* 310: 107-112.

Putadechakum S, Tanphaichitr V, Leelahagul P, Pakpeankitvatana V, Surapisitchart T, Komindr S. (2005) Long-term treatment of N-3 PUFAS on plasma lipoprotein levels and fatty acid composition of total serum and erythrocyte lipids in hypertriglyceridemic patients. *J Med Assoc Thai.* 88: 181-186.

## **Q**

Qi Q, Qi L. (2012) Lipoprotein(a) and cardiovascular disease in diabetic patients. *Clin Lipidol.* 7: 397-407.

## **R**

Rains JL, Jain SK. (2011) Oxidative stress, insulin signalling, and diabetes. *Free Rad. Biol. Med.* 50: 567-575.

Rainwater DL. (2000) Lipoprotein correlates of LDL particle size. *Atherosclerosis.* 148: 151-158.

Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Mesa MD, Gil A. (2012) Omega-3 long-chain



- polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials. *Br J Nutr.* 107 Suppl 2: S159-S70.
- Reavens GM. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-607.
- Recasens, M., Ricart, W., Fernández, J. (2004). Obesidad e inflamación. *Rev. Med. Univ. Navarra.* 48: 49-54.
- Reznick AZ, Packer L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233: 357-363.
- Rimoldi OJ, Finarelli GS, Brenner RR. (2001) Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 283: 323-326.
- Rivara ML, Di Genaro G, González Romero DJ. (2006) Homocisteína y enfermedad vascular oclusiva. *Rev. Postgrad. Cat. Med.* 154: 24-30.
- Rodríguez Mañas L, Neira Álvarez M, López-Dóriga Bonnardeaux P. Disfunción endotelial en la diabetes mellitus. *Hipertensión* 1998;15:217-28.
- Rolla AR.(1994) Resistencia insulínica. *Avan. Diabetol.* 8: 24-30.
- Ruiz M, Morosini MLR. (2011). *Diabetes Mellitus (cuarta edición)*. Akadia Editorial, Buenos Aires, Argentina.

## S

- Salcedo E, Zaro MJ, Rosino A, Martínez de Artola V. (2010). Estudio de la Lp(a) como marcador bioquímico de enfermedad ateromatosa. *Rev. Serv. Anal. Clin. HVR.* 11: 1-9.
- Sampathkumar R, Balasubramanyam M, Rema M, Premanand C, Mohan V. (2005) A novel advanced glycation index and its association with diabetes and microangiopathy. *Metabolism.* 54: 1002-1007.
- Sathiyapriya V, Selvaraj N, Nandeesh H, Bobby Z, Agrawal A, Pavithran P (2007) Enhanced glycation of hemoglobin and plasma proteins is associated with increased lipid peroxide levels in non-diabetic hypertensive subjects. *Acrh. Med. Res.* 38: 822-826.
- Schmitz-Peiffer C. (2000) Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal.* 12: 583-5894.
- Schmitz G, Ecker J. (2008) The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 47: 147-155.

- Simonson MS, Tiktin M, Debanne SM, Rahman M, Berger B, Hricik D, Ismail-Beigi F. (2012) The renal transcriptome of db/db mice identifies putative urinary biomarker proteins in patients with type 2 diabetes: a pilot study. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302: F820-F829.
- Sirtori CR, Galli C. (2002) N-3 fatty acids and diabetes. *Biomed Pharmacother.* 56: 397-406.
- Sniderman AD, Scantlebury T, Cianflone K. (2001) Hypertriglyceridemic hyperapoB: the unappreciated atherogenic dyslipoproteinemia in type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 135: 447-459.
- Spector AA, Yorek MA. (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *Lipid Res.* 26: 1015-1035.
- Sprague AH, Khalil RA. (2009) Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 78: 539-552.
- Steffen BT, Steffen LM, Tracy R, Siscovick D, Jacobs D, Liu K, He K, Hanson NQ, Nettleton JA, Tsai MY. (2012) Ethnicity, plasma phospholipid fatty acid composition and inflammatory/endothelial activation biomarkers in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Eur J Clin Nutr.* 66: 600-605.
- Suksomboon N, Poolsup N, Sinprasert S. (2011) Effects of vitamin E supplementation on glycaemic control in type 2 diabetes: systematic review of randomized controlled trials. *J. Clin Pharm Ther.* 36: 53-63.
- Syv anne M, Taskinen MR. (1997) Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet.* 350 (Suppl 1): 20-23.

## T

- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Salvetti A. (2000) Endothelial dysfunction in hypertension. *J. Nephrol.* 13: 205-210.
- Takahashi M, Kihara S, Tanaka S, Matsusawa Y, Blangero J, Cohen D, Kissebah A (2005). The Genetic Basis of Plasma Variation in Adiponectin, a Global Endophenotype for Obesity and the Metabolic Syndrome. *J. Clin. Endocr. Metab.* 86: 4321-4325.
- Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lams KS. (2002) Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 25: 1055-1059.
- Taskinen MR. (2003) Diabetic dyslipidemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia.* 46: 733-749.

Taskinen M-R. (2005) Type 2 diabetes is a lipid disorder. *Current Mol. Medicine.* 5: 297-308.

Thippeswamy\_ T, McKay JS, Quinn JP, Morris R (2006). Nitric oxide, a biological double-faced janus--is this good or bad?. *Histol. Histopathol.* 21: 445-458.

Thomas MC. (2011) Advanced glycation end products. *Contrib. Nephrol.* 170: 66-74.

Tibaldi JM. (2011) Intensifying insulin therapy in type 2 diabetes mellitus: dosing options for insulin analogue premixes. *Clin. Ther.* 33: 1630-1642.

Tinker L, Parks E, Berh S, Scheneeman B, Davis P. (1999) (n-3) fatty acid supplementation in moderately hypertriglyceridemic adults changes postprandial lipid and apolipoprotein B responses to a standardized test meal. *J Nutr* 129: 1126-1134.

Tynan MB, Nicholls DP, Maguire SM, Steele IC, McMaster C, Moore R, Trimble ER, Pearce J. (1995) Erythrocyte membrane fatty acid composition as a marker of dietary compliance in hyperlipidaemic subjects. *Atherosclerosis.* 117: 245-252.

## U

UKPDS (1998). United Kingdom Prospective Diabetes Study 24: a 6-year, randomized, controlled trial comparing sulfonylurea, insulin, and metformin therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes that could not be controlled with diet therapy. *Ann Intern Med.* 128: 165-175.

## V

Van Dijk KW, Rensen PC, Voshol PJ, Havekes LM. (2004) The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr. Opin. Lipidol.* 15: 239-246.

Van Hateren KJ, Landman GW, Kleefstra N, Drion I, Groenier KH, Houweling ST, Bilo HJ. (2011) Glycaemic control and the risk of mortality in elderly type 2 diabetic patients (ZODIAC-20). *Int. J. Clin. Pract.* 65: 415-419.

Vapaatalo H, Mervaala E. (2001) Clinically important factors influencing endothelial function. *Med. Sci. Monit.* 7: 1075-85.

Venkatesan S, Imrie H, Read S, Halliday D. (1995) ApoC subclasses from non-insulin-dependent diabetic patients-a quantitative comparison with control subjects. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 278S-288S.

Verdon CP, Burton BA Prior RL. (1995). Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding

interference by NADP<sup>+</sup> when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal. Biochem.* 224: 502-508.

Verstraete M. (1998) Hiperhomocisteinemia como factor de riesgo para la enfermedad arterial y venosa. *Bol. Red. Sanofi. Am. Lat.* 3: 612-622.

Vidgren HM, Agren JJ, Schwab U, Rissanen T, Hänninen O, Uusitupa MI. (1997) Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men. *Lipids.* 32: 697-705.

## **W**

Weissman PN (2002) Reappraisal of the pharmacologic approach to treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 90: 42G-50G.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004) Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27: 1047-53.

WHO (World Health Organization). (1998) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO Dec. 1998.

Wendland E, Farmer A, Glasziou P, Neil A. (2006) Effect of alpha linolenic acid on cardiovascular risk markers: a systematic review. *Heart.* 92: 166-169.

## **Y**

Yagi K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxides in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 121-216.

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nat Med.* 423:762 –769.

Yamauchi, T., Kamon, J., Wahi, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., y cols. (2001). The fat derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with bloth lipoatrophy and obesity. *Nat Med.* (7):941-946.

## **Z**

Zoccali, C., Mallamaci, F., Tripepi, G., (2002). Adiponectin, the most abundant adipocytederived protein, is functionally related to metabolic risk factors and predicts cardiovascular outcomes in end stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 41-134.

## 9.- Anexo

### APARTADO 1

#### - CONSENTIMIENTO INFORMADO -

Proyecto: Cupremia y colesterolemia como factores correlacionables con la performance cognitiva.

El que suscribe:..... en categoría de paciente, documento (DNI / LC / LE):....., domiciliado en la calle: ..... N°: ..... de la ciudad de: ..... (CP: .....) teléfono: .....; **HE SIDO DEBIDAMENTE INFORMADO Y ACUERDO** en participar en un estudio descriptivo-observacional transversal de características bioquímico-clínicas a llevarse a cabo en las instalaciones de la *Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP- INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata,)* con domicilio legal en calles 60 y 120 (S/N) del partido y ciudad de La Plata, teléfonos 0221-4824894 / 423-6967, según lo cual **AUTORIZA** al personal interviniente para la toma de muestras de sangre venosa periférica que será destinada a las pruebas indicadas en el protocolo experimental el cual ha sido apropiada y detalladamente descripto. Se deja explícita constancia que esta participación es de carácter **VOLUNTARIO**, sin pretensión alguna de resarcimientos económicos o de otro tipo, y que se **PERMITE** la divulgación total o parcial de los resultados obtenidos **en forma encriptada (sin la mención de nombres, apellidos, u otras señas personales identificatorias de ninguna índole)** en publicaciones científicas de la especialidad. Asimismo queda expresamente establecido que los muestreos se efectuarán con material descartable certificadamente estéril y apirogénico, a razón de una extracción mensual por el término de 6 meses y cuyo volumen será no mayor a 15 mL. Se **DELEGA** en el Médico, Fernando Ariel Marra (DNI: 21921798) y en el Director Científico Prof. Dr. Carlos Alberto Marra (DNI: 11503735) toda supervisión de procedimientos como así también el derecho a recabar información mínima complementaria asociada a la muestra en cuestión. Por otra parte se **ESTABLECE** que el paciente (o su representante legal) tienen el derecho absoluto e irrevocable de retirarse del estudio en cuanto así lo consideren pertinente y a exigir la destrucción de la(s) muestra(s) de sangre oportunamente donada(s) junto con toda otra documentación relacionada que no haya sido encriptada al momento de la toma de decisión. El donante ejerce también el derecho irrevocable de conocer en todo momento los resultados de sus exámenes siempre y cuando consienta por escrito la identificación de su muestra en forma preliminar a su procesamiento. Queda también establecido que se **ASEGURA** la máxima protección en relación a la transmisión de enfermedades infecto-contagiosas, o de otra índole, que devengaran de la manipulación inapropiada de las muestras que se suministren durante el procedimiento de extracción de sangre. **QUEDA CONSTANCIA** que una vez concluida la investigación el material remanente será destruido por autoclavado a 120 °C durante una hora y dispuesto según las regulaciones vigentes sobre bioseguridad ambiental. Asimismo queda establecido que este estudio se rige en un todo de acuerdo con los considerandos de Ley 25326 (*Honorable Cámara de Diputados de la Nación Argentina; Dirección Nacional de Protección de Datos Personales*) para el legítimo resguardo de la confidencialidad de toda la información inherente a cada participante y se cife a la regulatoria y medidas de implementación de la jurisprudencia vigente, cuya copia se adjunta bajo el "Adjunto-I" de este consentimiento.....

Se firman 2 (dos) ejemplares de un mismo tenor frente a los responsables que abajo se detallan, y en presencia de 2 (dos) testigos) a los ..... días del mes de .....de ....., en la ciudad de La Plata. ....

-----  
Firma responsable /aclaración

-----  
Firma/aclaración

-----  
Firma/aclaración

-----  
Firma/aclaración Testigo 1

-----  
Firma/aclaración Testigo 2

#### Adjunto-I

Para mejor proceder se adjunta en formato "portable document file o pdf" copia de la Ley 25326 en su texto original y actualizado, el cual puede asimismo descargarse del sitio oficial de la Honorable Cámara de Diputados de la Nación Argentina: <http://www1.hcdn.gov.ar/dependencias/dip/textos%20actualizados/25326.010408.pdf>

**APARTADO 2****ENCUESTA NUTRICIONAL RETROSPECTIVA****ENNyS (Encuesta Nacional de Nutrición y Salud)****Sub-cuestionario de frecuencia para clasificación de hábitos y demografía (modificado).****Sector G:**

Fecha: ...../...../.....

Identificación del paciente:

Edad: ..... años

Peso: ..... kg

Talla: ..... m ..... cm

BMI: ..... kg/m<sup>2</sup>**Demográficos (anexo):**Estado civil/condición de vida (colocar número que corresponda): .....

Soltera/o viviendo sola/o (1)

Soltera/o viviendo con su pareja (2)

Separada/o, viuda/o o divorciada/o viviendo sola/o (3)

Separada/o, viuda/o o divorciada/o viviendo en pareja (4)

Casada/o y viviendo con su cónyuge (5)

Paciente viviendo en el seno de su familia/cuidador familiar (6)

Paciente viviendo a cargo de cuidador no familiar (7)

Paciente viviendo en institución (8)

Paciente en régimen mixto/casa de día (9)

Clase socioeconómica (colocar número que corresponda):

Debajo de la línea de pobreza (1)

Baja (2)

Media-baja (3)

Media-alta (4)

Alta (5)

Escolaridad:

Años completos:

Conocimiento de idiomas (otro(s) además del nativo:

NO

SI

Raza o etnia (colocar el número que corresponda):

- Negro (1)  
 Afro-americano (2)  
 Blanco caucásico (3)  
 Mestizo/indígena (4)  
 Hispano (5)  
 Asiático (6)

**¿Cada cuánto realiza actividad física por semana? (llenar con tinta el cuadrado que corresponda)**

- 1 o 2 días  (1)  
 3 o 4 días  (2)  
 5 o 6 días  (3)  
 Diariamente  (4)  
 Nunca  (5)

**¿Qué tipo de actividad física?**

Caminatas  (1) ..... horas por sesión:  $\frac{1}{2}$  ; 1 ;  $1\frac{1}{2}$  ; 2 ; >2

Otra/s  (2)

Indique cuál/es: .....

horas por sesión:  $\frac{1}{2}$  ; 1 ;  $1\frac{1}{2}$  ; 2 ; >2

**Desayuno**

- Siempre  (1)  
 Casi siempre  (2)  
 A veces  (3)  
 Nunca  (4)

**Almuerzo**

- Siempre  (1)  
 Casi siempre  (2)  
 A veces  (3)  
 Nunca  (4)

**Merienda**

- Siempre  (1)  
 Casi siempre  (2)  
 A veces  (3)  
 Nunca  (4)

**Cena**

- Siempre  (1)  
 Casi siempre  (2)  
 A veces  (3)  
 Nunca  (4)

**Sector P:**

**¿Qué tipo de carnes consume y con que frecuencia semanal?**



Ovino  (1) ..... por semana

Porcino  (2) ..... por semana

Vacuno  (3) ..... por semana

Pescados  (4) ..... por semana

Aves  (5) ..... por semana

**¿Con qué frecuencia consume huevos?**

Una vez a la semana  (1)

Dos veces a la semana  (2)

Tres veces a la semana  (3)

Cuatro veces a la semana  (4)

Diariamente  (5)

**¿Con qué frecuencia consume quesos semiduros/duros?**

Una vez a la semana  (1)

Dos veces a la semana  (2)

Tres veces a la semana  (3)

Cuatro veces a la semana  (4)

Diariamente  (5)

**¿Con qué frecuencia consume otros lácteos? : leche - quesos blandos – yogourth - ricota**

Una vez a la semana  (1)

Dos veces a la semana  (2)

Tres veces a la semana  (3)

Cuatro veces a la semana  (4)

Diariamente  (5)

**Sector L:**

**¿Qué tipo de grasas ó aceites utiliza en la preparación de alimentos?**

Grasa  (1)

Aceite  (2)

Manteca  (3)

Margarina  (4)

**¿En qué preparaciones utiliza las grasas ó aceites para cocción, con *más* frecuencia?**

Frituras  (1)

Salteados  (2)

Para untar asaderas/hornear  (3)

**¿Con qué frecuencia?**

Habitualmente  (1) (3 ó más veces por semana)

Ocasionalmente  (2) (1-2 veces por semana)

Nunca  (3) (<1 vez por mes o menos)

**¿Qué aceites y/o aderezos utiliza para condimentar?**

a) *Aceite de:*

Girasol  (1)

Maíz  (2)

Mezcla  (3)

Oliva  (4)

Soja  (5)

Otro  (6)

**Los utiliza:**

Habitualmente  (1) (3 ó más veces por semana)

Ocasionalmente  (2) (1-2 veces por semana)

Nunca  (3) (1 vez por mes o menos)

*b) Aderezos:*

Mayonesa  (1)

Manteca  (2)

Margarina  (3)

Otros  (4)

**Los utiliza:**

Habitualmente  (1) (3 ó más veces por semana)

Ocasionalmente  (2) (1-2 veces por semana)

Nunca  (3) (1 vez por mes o menos)

**¿Con qué frecuencia consume?:**

Alfajores/confituras: ..... unidades por semana

Chocolates: ..... “

Papas fritas: ..... “

Embutidos: ..... “

**¿Con qué frecuencia (habitualmente = 1, ocasionalmente = 2, nunca = 3) consume?:**

Café: .....

Te: .....

Mate: .....

Tabaco: .....

Alcohol: .....

**¿Con que frecuencia consume maníes, avellanas, nueces, almendras?**

Habitualmente  (1) (3 ó más veces por semana)

Ocasionalmente  (2) (1-2 veces por semana)

Nunca  (3) (1 vez por mes o menos)

**Sector M:**

**¿Cocina con sal?**

Sí  (1)

No  (0)

**¿Qué tipo de sal agrega?**

Sal común  (1)

Sal de bajo contenido en sodio  (2)

Sal sin sodio  (3)

¿Cuál sería su promedio de ingesta de agua/día en cualquier forma?

Menos de medio litro  (1)

Entre ½ litro y litro  (2)

Mas de un litro  (3)

¿Cuál es la fuente de agua empleada para cocinar?

Agua de red domiciliaria  (1)

Agua de pozo  (2)

Agua envasada  (3)

Agua de red o de pozo filtrada  (4)

¿Cuál es la fuente de agua empleada para beber y preparar infusiones, jugos, etc.?

Agua de red domiciliaria  (1)

Agua de pozo  (2)

Agua envasada  (3)

Agua de red o de pozo filtrada  (4)

¿En qué zona del Gran La Plata habita? (nombre del barrio, paraje, intersección de calles/avenidas aproximad.)

.....  
 .....

**Sector F:**

Indique con (X) en el casillero correspondiente, el consumo histórico de:

<i>Alimentos</i>	<i>A diario</i>	<i>Habitualmente (2-3 porciones/sem.)</i>	<i>Casi nunca (&lt; 2 porciones/sem.)</i>	<i>Nunca</i>
Legumbres				
Brócoli				
Coliflor				
Zapallo común/calabaza				
Frutas crudas (NO cítricos)				
Naranjas/pomelos/mandarinas				
Tomates				
Zanahorias				
Verduras de hoja crudas				
Verduras de hoja cocidas				
Nueces, almendras				

**Sector H:**

Indique con (X) en el casillero correspondiente el consumo histórico de:

<b>Alimentos</b>	<b>A diario</b>	<b>Habitualmente (2-3 porciones/sem.)</b>	<b>Casi nunca (&lt; 2 porciones/sem.)</b>	<b>Nunca</b>
Pan blanco				
Pan integral				
Avena				
Arroz				
Miel				
Azúcar blanco				
Mermeladas/dulces				

**Sector O: (solo destinado al Médico)**

Indicar si existen perversiones del gusto, fijaciones, u otros desórdenes relacionados que tengan injerencia en la conducta alimenticia:

.....

.....

.....

.....

## APARTADO 3

### ENCABEZADOS DE LAS PLANILLAS EXCEL PARA LA RECOGIDA DE DATOS

#### HISTORIA CLINICA / DATOS BASALES / OTROS

Notas aclaratorias:

- (1) Indicar con una "X" si es NO. En caso positivo, cuantificar número de cigarrillos-día; Ej.12  
 (2) Si no bebe colocar X en NO. Si bebe BO: Bebedor ocasional/social; EM: por encima de la media; A: alcohólico.  
 (3) En milímetros de Hg  
 (4) Usando el IMC indicar si hay infrapeso (IP), bajo peso (BP), peso normal (PN), sobrepeso (SP), obesidad premórbida (OPM) o mórbida (OM).  
 (5) Marcar con una "X". Cumple criterios síndrome metabólico: hipoglucemia / hipertensión / dislipemia / sobrepeso / hipertensión / resistencia insulínica / hiperinsulinemia

ENCRIPTADO	FUMADOR		CONSUMO ALCOHOL		PRESIÓN ARTERIAL(3)		Clas. ICM (4)	Síndrome Metabólico	
	SI (1)	NO	SI (2)	NO	SIST.	DIAST.		SI (5)	NO

#### HISTORIA CLINICA / DATOS BASALES QCA. CLINICA

Todos datos obligatorios, excepto los marcados con \* (CCE: clearance de creatinina endógena, Lipemia y NEFA: ácidos grasos libres en plasma).

Otros datos justificados para signo-sintomatologías especiales deben consignarse aparte (por ejemplo: hematograma o hepatograma patológicos, etc.). Ver anexos.

ENCRIPTADO	GLUCOSA (mg/dl)		UREA (mg/dl)	CREAT. (mg/dl)	URICO (mg/dl)	Colest. Tot. (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	TAG (mg/dl)	Riesgo aterog.
	Ayunas	Post-prand.								

Album. (orina)	CCE* (mL/min)	Album. (plasma)	Prot. (plasma)	HbA1c (%)	Lipemia* (mg/dl)	NEFA* (mEq/L)
-------------------	------------------	--------------------	-------------------	--------------	---------------------	------------------

Hm: hematocrito en %

GR: eritrocitos en millones. GB: blancos en miles. "Otros" indicar algún índice hematimétrico anormal. ERS: en mm (1ra. Hora)

TGP y TGO: transaminasas; en "otros" indicar alguna otra determinación espeicla por ejemplo colinesterasa si fuera patológica

ENCRIPADO	Hematología					
	Hm	GR	GB	% Linfocitos	Otros	ERS

Función hepática						OTROS					
TGP	TGO	Bil. Conj.	Fosf. Alcal.	Gamma-GT	Otros						

Historia clínica detallada en la que se llevarán comentarios patculares que se crean necesarios o pertinentes

Se indicará el encriptado que le corresponde a la historia y luego se hará la referencia específica. Ver ejemplo.

CM2503

Este paciente presentó dolor precordial intermitente en fecha...., y su ECG indicó... las enzimas cardíacas fueron... Se medicó con ..... y evolucionó ....

(1) Indicar nombre **no comercial** de la droga

(2) Señalar la razón de la indicación, **otra que no sea DM2**, por ejemplo "Alergia", "Contracepción oral", etc.

(3) Detallar dosis diaria y vía de administración (O: oral, ID: intra-dérmica, etc.)

LISTADO PACIENTES SIN INSULINA			
ENCRIPTADO	Droga (1)	Indicación (2)	DOSIS (3)
	Nombre genérico	(no base)	(diaria)

LISTADO PACIENTES CON INSULINA (SOLA O COMBINADA)			
ENCRIPTADO	Droga (1)	Indicación (2)	DOSIS (3)
	Nombre genérico	(no base)	(diaria)