

Inmunoglobulinas glicosiladas en pacientes con macroangiopatía diabética

Glycosilated immunoglobulins in patients with diabetic macroangiopathy

M. E. Triana Mantilla (*) - J. Y. Fernández Montequín (**) - A. Aldama Figueroa (***) - H. M. Castro Elías. (****)

**Instituto Nacional de Angiología
y Cirugía Vascular
Ciudad de La Habana. Cuba**

RESUMEN

Objetivos: Cuantificar las concentraciones séricas de inmunoglobulinas glicosiladas (Iggc) en pacientes con macroangiopatía diabética y precisar si el parámetro es afectado por el sexo, el tipo de diabetes mellitus y el grado de control metabólico.

Material y métodos: Se estudiaron 87 pacientes con macroangiopatía diabética, sin distinción de sexo y tipo de diabetes mellitus (DM), con una edad promedio de 62,5 años y, como grupo de referencias, 43 personas sanas no diabéticas con un rango de edad entre 32 y 68 años. Se cuantificaron las concentraciones de glucosa, fructosamina (FA), inmunoglobulinas glicosiladas (Iggc) y el porcentaje (%) de hemoglobina glicosilada (HbA1c).

Resultados: Los diabéticos tenían concentraciones de Igglc significativamente mayor ($p < 0,001$) que los no diabéticos, independiente del tipo de DM. Los pacientes mal controlados ($FA \geq 2,7 \text{ mmol/L}$) mostraron niveles de Igglc más altos ($p < 0,001$) que los bien controlados ($FA < 2,7 \text{ mmol/L}$). Correlaciones lineales directas fueron encontradas entre los valores de Igglc: glucosa ($r = 0,36$ $p < 0,05$), HbA1c ($r = 0,399$ $p < 0,05$) y FA ($r = 0,39$ $p < 0,05$). No hubo diferencia significativa en los niveles de Igglc entre hombres y mujeres.

(*) Lic. en Bioquímica. Investigador titular responsable de los laboratorios de lípidos y carbohidratos. INACV.

(**) Especialista de 1.^o y 2.^o grado en Angiología y Cirugía Vascular. Investigador auxiliar. Director del INACV.

(***) Especialista de 1.^o y 2.^o grado en Fisiología Normal y Patológica. Dr. en Ciencias Médicas. Investigador y profesor titular. Jefe del Departamento de Hemodinámica vascular. INACV.

(****) Técnico químico analista. INACV.

Conclusiones: La Igglc está incrementada en los pacientes diabéticos, independiente del tipo de DM y del sexo, pero el aumento depende del control glicémico de los mismos.

Palabras claves: Glicosilación no enzimática, diabetes mellitus, complicación vascular, control glicémico, inmunoglobulinas.

SUMMARY

Objective: To measure serum levels of glycosilated immunoglobulins (Iggc) in patients with a diabetic macroangiopathy, and to assess potential influences of sex, type of diabetes or metabolic control on them.

Materials and Methods: A series of 87 patients with diabetic macroangiopathy (male and female, regardless of diabetes type; mean age 62,5 years) and a control group of 43 non-diabetic healthy volunteers (age, 32-68 years) were studied. Glucose, fructosamine (FA) and glycosilated immunoglobulins (Iggc) levels, as well as percentage (%) of glycosilated hemoglobin (HbA1c) were measured.

Results: Igglc levels in diabetic patients were significantly higher ($P < 0,001$) than in non-diabetic patients, regardless of DM type. Igglc levels were also higher in poorly controlled patients ($FA \geq \text{mmol/L}$) than in well controlled patients ($FA < 2,7 \text{ mmol/L}$) ($p < 0,001$). Direct linear correlations were found between Igglc levels and the following variables: glucose ($r = 0,36$; $p < 0,05$), HbA1c ($r = 0,399$; $p < 0,05$), and FA ($r = 0,39$; $p < 0,05$). No significant differences were observed for Igglc levels between men and women.

Conclusions: Increase Igglc are found in diabetic patients, regardless of DM type and sex, but the increase depends on glycemic control in these patients.

Key words: Non-enzymatic glycosylation, diabetes mellitus, vascular complications, glycemic control, immunoglobulins.

Introducción

El efecto citotóxico de la glucosa sobre las proteínas plasmáticas y tisulares provoca que las mismas modifiquen sus propiedades físico-químicas y pierdan sus funciones biológicas. El ataque directo de la glucosa sobre las proteínas se conoce como proceso de Glicosilación No Enzimática (GNE) (1, 2). El estudio de la GNE ha cobrado gran importancia en los últimos tiempos por presentar una participación directa en la fisiopatología de las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus (DM) (3-6).

Se supone que la glicosilación de las proteínas del sistema inmune pudiera tener algún papel en la susceptibilidad incrementada que tienen los diabéticos a la sepsis.

El objetivo de este trabajo fue determinar las concentraciones de Igglc en pacientes con macroangiopatía diabética e identificar si el parámetro está afectado por la edad, el sexo, el tipo de DM y el grado de control glicémico.

Material y métodos

Se estudiaron 87 pacientes diabéticos, ambulatorios con el diagnóstico clínico y hemodinámico de la macroangiopatía diabética, sin lesiones tróficas y procesos sépticos asociados. La muestra fue seleccionada de los pacientes que asistieron a la consulta de Prevención de Angiopatía Diabética del Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular (INACV), sin distinción de sexos y con un tiempo de conocida la diabetes que osciló entre 1 y 40 años.

La muestra incluía ambos tipos de DM, donde el 34,5% (N=30) eran diabéticos tipo I (DMTI) con una edad promedio de 53,9 años (rango: 24-76 años) y el 65,5% (N=57) eran diabéticos tipo II (DMTII) con un promedio de edad de 65,1 años (rango: 46-86 años).

El grupo de referencia estuvo integrado por 43 personas supuestamente sanas, no diabéticas, de ambos sexos y con una edad promedio de 50 años (rango, 32-68 años), todas procedentes de las áreas de salud del Municipio Cerro.

La toma de muestra sanguínea se efectuó en el horario de la mañana, después de un ayuno de 12 horas, mediante punción de una vena del antebrazo estando los pacientes en posición decúbito supino.

A todas las muestras se le cuantificaron las concentraciones séricas de glucosa con un juego de reactivos

comercial de glucosa-oxidasa de la firma alemana Boehringer-Mannheim, de fructosamina (FA) (7) y el porcentaje (%) de hemoglobina glicosilada (HbA1c) (8).

La cuantificación de las Igglc se realizó por el siguiente procedimiento:

Obtención de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas fueron obtenidas por precipitación selectiva con sulfato de amonio saturado $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. A un 1 mL de suero se le añadió 1 mL de solución precipitante, la que se dejó en reposo por 10 minutos; pasado este tiempo se centrifugó 15 minutos a 4.000 r.p.m.. El precipitado se lavó 3 veces con solución precipitante diluida 1:2, manteniendo las mismas condiciones de reposo y centrifugación, después de lo cual fue conservado a menos 20 °C hasta la medición del grado de glicosilación. Como criterio de pureza se realizó una inmunoelectroforesis utilizando antisueros específicos contra proteínas plasmáticas totales, albúmina e inmunoglobulina G (IgG).

Cuantificación del grado de glicosilación de las inmunoglobulinas:

El precipitado se disolvió en 1 mL de buffer bicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$) 0,1 mol/L a pH de 10,3. A un tubo de ensayo que contiene 500 μL de una preparación de nitroazul de tetrazolium (NBT) 0,25 mmol/L en el buffer de bicarbonato, se le añadió 50 μL del precipitado disuelto. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 56 °C, pasado este tiempo la reacción de color fue detenida con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2,5 eq-g/L. La absorbancia fue leída a una longitud de onda (λ) de 530 nm contra blanco reactivo.

Patrones:

Se trabajó con un patrón secundario consistente en una mezcla de suero de pacientes diabéticos con concentraciones de FA superior a 5 mmol/L, el cual fue calibrado contra el 1-Deoxi-1-Morfolino-D-Fructosa (DMF) a una concentración de 4 mmol/L. La curva fue construida con 4 patrones a concentraciones de 4, 2, 1 y 0,5 mmol/L.

El procedimiento fue validado con el método descrito por Triville y colaboradores (8), la precisión fue determinada mediante la prueba de repetibilidad a un pool de suero de donantes voluntarios.

Análisis estadístico

Se calculó la media (\bar{x}) como medida del valor central, la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV) y el Error Típico de la Media (ETM), como medidas de dispersión. El análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba *t* de Student para muestras no pareadas fueron los estadísticos utilizados para comparar los resultados. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para conocer la asociación entre los valores de Igglc determinados por dos técnicas diferentes; también se realizó una matriz de correlación para precisar la relación entre las variables estudiadas. Los resultados son expresados en media \pm ETM.

Resultados

El método usado mostró un coeficiente de variación de 4,06 %. La prueba de normalidad indicó que las concentraciones de Igglc tenían una distribución normal en la muestra estudiada. Una correlación lineal directa se encontró al asociar los valores de Igglc por las dos técnicas empleadas en la validación del procedimiento ensayado, con un valor para el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) igual a 0,7, un nivel de significación de $p<0,05$. La ecuación de la línea de regresión tuvo la siguiente expresión: $y = 0,91x + 0,05$.

Al analizar cómo se comportaban las distintas variables en cada grupo se encontró que los diabéticos tenían mayor edad ($p<0,001$) y más número de mujeres que el grupo de referencia, así como niveles elevados ($p<0,001$) de glicemia, FA y HbA1c (Tabla 1).

Las concentraciones de Igglc fueron mayores ($p<0,001$) en los diabéticos que en los controles, independientemente del tipo de DM.

Con relación al grado de control metabólico, los pacientes diabéticos con un mal control glicémico (FA<2,7 mmol/l) presentaron niveles elevados de Igglc ($p<0,001$) con respecto a aquellos bien controlados (FA \geq 2,7 mmol/l). Este resultado fue independiente del tipo de DM.

Como la distribución por sexo fue diferente en los grupos, se quiso conocer si el mismo pudiera o no influir en los resultados obtenidos. El análisis precisó que no hubo diferencias significativas en las niveles de Igglc de los hombres con respecto a las mujeres ($0,27 \pm 0,018$ vs. $0,28 \pm 0,014$). La Tabla II recoge el resultado de la matriz de correlación. Se puede apreciar que se encontraron correlaciones lineales directas entre las concentraciones de Igglc con los niveles de glicemia, FA y HbA1c.

Tabla II

Valores de los coeficientes de correlación y su significación estadística

		<i>r</i>	<i>p</i>
Igglc vs	Glicemia	0,36	<0,05
	HbA1c	0,39	<0,05
	Fructosamina	0,399	<0,05

Discusión

La hiperglicemia es un factor de riesgo para la aparición y progresión de las diferentes formas clínicas de la enfermedad vascular en los pacientes (9-11).

La modificación proteica resultante del proceso de glicosilación está elevada en los diabéticos, pero poco se

Tabla I
Datos generales de los grupos estudiados

Grupos	Sexo F / M	Edad Años	Glicemia mmol/L	Fructosamina mmol/L	HbA1c %
DMT I N = 30	14 / 16	53,9 \pm 2,87	10,1 \pm 0,87*	4,92 \pm 0,49*	12,1 \pm 0,77*
DMT II N = 57	38 / 19	65,1 \pm 1,3*	6,74 \pm 0,55*	4,06 \pm 0,34*	9,3 \pm 0,38*
Referencia N = 43	14 / 29	50,0 \pm 2,64	3,8 \pm 0,198	2,09 \pm 0,08	7,3 \pm 0,19

ANOVA * $p<0,001$

conoce de lo que sucede con las inmunoglobulinas. Los pocos trabajos que existen en la literatura son muy específicos para las IgG glicosiladas (12, 13). En este estudio se cuantificó la concentración de todas las inmunoglobulinas que se encuentran modificadas por la GNE, sin especificar cuál de las familias era la que tenía un mayor grado de glicosilación.

El incremento en la concentración de Igglc en los diabéticos fue un resultado esperado por cuanto la diabetes por sí misma se caracteriza por una elevación en los niveles de glucosa, que puede llevar implícito la aceleración del proceso de GNE.

El control glicémico de los diabéticos a corto (FA) y a largo plazo (HbA1c) fue malo en sentido general. Al analizar si el mismo influía o no en los resultados obtenidos se encontró que, independientemente del tipo de DM, los pacientes mal controlados tenían un aumento en las concentraciones de Igglc con respecto a los que mostraron un buen control glicémico.

Lo anterior se ve confirmado con el hallazgo de las correlaciones lineales directas encontradas entre las concentraciones de Igglc con las de glicemia, FA y HbA1c. El hecho de una asociación con la HbA1c, control a largo plazo, hace pensar que las proteínas modificadas permanecen más tiempo en la circulación por verse afectado su catabolismo.

El no haber encontrado diferencias en los valores de Igglc entre hombres y mujeres hace pensar que el sexo no influyó en el resultado, a pesar de que la muestra estudiada era en su mayoría del sexo femenino.

Si bien no fue objetivo del trabajo conocer la utilidad de las Igglc como índice de control glicémico, sí se trató de encontrar una aproximación a la significación biológica que pudiera ofrecer los cambios en su concentración.

Los estudios sobre la GNE abrieron nuevos campos de investigación con vista a esclarecer las posibles alteraciones biológicas de las inmunoglobulinas, su capacidad de unirse al antígeno o modificar su habilidad para activar el sistema complemento, muy en especial esclarecer la susceptibilidad del diabético a la sepsis, lo que será motivo de estudio en otras investigaciones.

Conclusiones

La Igglc está incrementada en los pacientes diabéticos independiente del tipo de DM y del sexo, pero el aumento en los mismos depende del control glicémico.

BIBLIOGRAFIA

1. KENNEDY, L.; MEHL, T. D.; ELDER, E.; VARGHESE, M.; MERIMEE, T. J.: Non enzymatic glycosylation of serum and plasma proteins. *Diabetes*, 1982; 31:52-6.
2. ARENBRUSTER, D. A.: Fructosamine; Structure, analysis and clinical usefulness. *Clin. Chim.*, 1987; 33:2153-63.
3. BROWNLEE, M.: Glycation and diabetics complications. *Diabetes*, 1994; 43:836-41.
4. KENNEDY, L.; LYONS, T. J.: Glycation, oxidation and lipoperoxidation in the development of diabetic complication. *Metabolism.*, 1997; 46:14-21.
5. BROWNLEE, M.: Glycation products and the pathogenesis of diabetics complications. *Diabetes Care*, 1992; 15:1835-43.
6. BROWNLEE M.: Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Ann. Rev. Med.*, 1991; 42:159-66.
7. JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER, J. R.: Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta*, 1982; 127:87-95.
8. FLÜCKINGER, R.; WINTERHALTER, K. H.: In vitro synthesis of haemoglobin Alc. *FEBS Lett.*, 1976; 71:356-60.
9. LAAKSO, M.: Glycemic control and risk for coronary heart disease in patients with non insulin dependent diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*; 124 (1 pt 2): 127-30.
10. KLEIN, R.; KLEIN B. E. K.; MASS, S. E.: Relation of glycemia control to diabetic microvascular complications in diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*, 1996; 124:90-6.
11. NATHAN, D. M.: The pathophysiology of diabetic complications: how much does the glucose hypothesis explain? *Ann. Intern. Med.*, 1996, 124 (1 pt 2):36-9.
12. DANZE, P. M.; TARJOMAN, A.; ROUSSEAU, J.; FOSSAT, P.; DAUTREVAUX, M.: Evidence for an increased glycation of IgG in diabetic patients. *Clin. Chim. Acta*, 1987; 166:143-53.
13. KANESHIGE, H.: Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effect on antibody activity in patients with diabetes mellitus, *Diabetes*, 1987; 36: 822-8.
14. WOCHNER, R. D.: Hipercatabolism of normal IgG: an unexplained immunoglobulin abnormality in the connective tissue diseases. *J. Clin. Invest.*, 1970; 49:454-64.