

Glucación no enzimática de la antitrombina. Implicaciones en el riesgo trombótico de pacientes con diabetes mellitus

H. Cano^a, D. Hernández-Espinosa^a, A. Miñano^a, M.L. del Rey^a, F. Illán^b, M.S. Alcaraz^b, M. Pascual^b, J.A. Guerrero^a, V. Vicente^a y J. Corral^a

^aDepartamento de Medicina. Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia. Murcia. España.

^bSección de Endocrinología. Hospital Morales Meseguer. Murcia. España.

Introducción/objetivos. La glucación no enzimática incorpora azúcares a los residuos lisina y arginina de proteínas, lo que puede alterar su función. La glucación de la antitrombina, un potente anticoagulante natural, podría asociarse con el riesgo trombótico observado en situaciones de hiperglucemia, como la diabetes mellitus. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la glucación de la antitrombina y determinar si es relevante en las complicaciones trombóticas de la diabetes mellitus.

Métodos. 1. Glucación no enzimática *in vitro* de antitrombina plasmática y purificada con metilglioxal y glucosa. 2. Se analizó el efecto de diferentes compuestos sobre la glucación no enzimática de la antitrombina *in vitro*. 3. Estudio de 101 pacientes diabéticos. En todas las muestras se analizaron los valores antigénicos, la actividad anti-FXa, las características conformacionales y la afinidad a la heparina de la antitrombina.

Este estudio ha sido financiado con las ayudas de la Fundación Séneca (00583/PI/04) y SAF2003-0840 (MCYT & FEDER). Este trabajo ha sido agraciado con una mención especial del Congreso de la SEA de 2004. H. Cano dispone de un contrato de formación en investigación dentro del Programa de Recursos Humanos y Difusión de la Investigación del Instituto de Salud Carlos III. Madrid. J. Corral es investigador del programa Ramón y Cajal de la Universidad de Murcia.

Correspondencia: Dr. J. Corral.
Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia.
Ronda de Garay, s/n. 30003 Murcia. España.
Correo electrónico: jcc@um.es

Recibido el 15 de diciembre de 2004 y aceptado el 17 de febrero de 2005.

Resultados. La glucación no enzimática *in vitro* de la antitrombina con metilglioxal o glucosa no ocasiona modificaciones conformacionales significativas en la molécula, pero induce su transformación a una forma con baja afinidad por la heparina, que explica la pérdida significativa de su actividad (valor < 40% del basal). Este efecto se previene con heparina, aminoguanidina y catequina. Los pacientes diabéticos muestran menores valores antigénicos y funcionales de antitrombina (80%) que los sujetos controles, pero esta disminución no se correlaciona con la glucemia ni con los valores de hemoglobina glucosilada.

Conclusiones. La glucación de residuos lisina y arginina localizados en el sitio de unión a la heparina de la antitrombina reduce significativamente su actividad anticoagulante, aunque puede ser protegida por la heparina, la aminoguanidina y la catequina. Sin embargo, la relevancia de la glucación de la antitrombina en pacientes diabéticos es apenas perceptible debido a la lenta acción glucante de la glucosa, y a la reducida vida media de la antitrombina.

Palabras clave:

Antitrombina. Glucación. Metilglioxal. Diabetes mellitus.

NON-ENZYMATIC ANTITHROMBIN GLYCATION. ASSOCIATION WITH ATHEROTHROMBOTIC RISK IN DIABETIC PATIENTS

Introduction/Aims. Non-enzymatic glycation of proteins can impair their function by incorporating sugars into their lysine and arginine residues.

Glycation of antithrombin, a powerful anticoagulant, might be associated with the thrombotic risk observed in hyperglycemic conditions such as diabetes mellitus. Our aim was to study the effects of antithrombin glycation and determine its significance in the thrombotic complications observed in diabetes.

Methods. 1) *In vitro* study of non-enzymatic glycation of purified and plasma antithrombin by their incubation with methylglyoxal and glucose. 2) The effect of different compounds on the *in vitro* glycation of antithrombin was analyzed. 3) We studied 101 diabetic patients. Antigen levels, anti-FXa activity, conformational features and antithrombin affinity to heparin were determined.

Results. *In vitro* non-enzymatic glycation of antithrombin with methylglyoxal or glucose caused no significant conformational change in the molecule, but induced the transformation to a low heparin-affinity form, which explains the significant loss of activity observed (< 40% of basal). This effect was prevented by heparin, aminoguanidine and catechin. Diabetic patients presented lower antigenic and antithrombin functional levels (80%) than controls. However, no correlation between activity or antigen levels of antithrombin and glycemia or glycosylated hemoglobin was found in diabetic patients.

Conclusions. *In vitro* glycation of lysine and arginine residues located in the heparin-binding site of antithrombin significantly reduces its anticoagulant activity. Interestingly, heparin, aminoguanidine and catechin prevented this effect. However, the non-enzymatic glycation of antithrombin in diabetic patients seems to be mild, since the action of glucose is very slow and the half life of antithrombin in plasma is short.

Key words:

Antithrombin. Glycation. Methylglyoxal. Diabetes mellitus.

Introducción

La diabetes mellitus representa un problema de salud mundial, con una prevalencia en los países desarrollados del 6% en las personas con edades comprendidas entre los 20 y 74 años¹. Una importante complicación asociada con la diabetes mellitus es el estado hipercoagulable que genera, con valores elevados de los marcadores procoagulantes, como los fragmentos 1+2 de la protrombina y los complejos trombina-antitrombina². De hecho, el 80% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 fallece como consecuencia de un episodio trombóti-

co, fundamentalmente cardiovascular². Los daños en la microvasculatura (retinopatía, neuropatía y nefropatía) suponen también una causa frecuente de morbilidad en estos pacientes². El mecanismo por el cual la falta del control glucémico predispone al desarrollo de complicaciones vasculares no se conoce totalmente, pero la glucación no enzimática es uno de los mecanismos propuestos de mayor relevancia³. La glucación no enzimática se define como la reacción de azúcares con grupos amino de ácidos nucleicos o de proteínas plasmáticas y/o tisulares (especialmente con residuos lisina y arginina). La secuencia de reacciones químicas que comprende la glucación no enzimática implica la producción rápida (horas) de productos inestables (bases de Schiff) y más lenta (días) de productos estables (productos de Amadori). Los posteriores procesos de oxidación dan lugar a la formación de metabolitos de la glucosa, entre los que destacan la deoxiglucosa, el metilglioxal y el glioxal (que tienen una capacidad mucho mayor de reaccionar con los grupos amino de las proteínas y ácidos nucleicos), y culminan con la formación de productos de glucación avanzada (AGE, *advanced glycation end products*)^{4,5}. La glucación de proteínas se ha asociado con la patogenia de diferentes enfermedades, en especial las complicaciones macrovasculares y microvasculares de la diabetes mellitus, el Alzheimer, las cataratas o la enfermedad tromboembólica^{6,7}. Las complicaciones asociadas con una excesiva glucación se han evaluado principalmente según la formación de AGE. Sin embargo, apenas se han investigado los efectos que la propia glucación podría tener sobre las características estructurales, bioquímicas y funcionales de las proteínas afectadas.

La antitrombina, perteneciente a la superfamilia de las serpinas (inhibidores de serina proteasas), es el principal anticoagulante fisiológico, ya que inhibe a la trombina y otras serina proteasas de la coagulación (factores Xa, IXa, XIa, XIIa y calicreína). Esta serpina, rica en residuos arginina y lisina, es una potencial diana de los procesos de glucación no enzimática. Además, la antitrombina es una molécula conformacionalmente sensible, incluso a pequeñas modificaciones tanto ambientales como genéticas, que pueden tener importantes implicaciones funcionales⁸. Los trabajos realizados hace 2 décadas ya sugerían una susceptibilidad de la antitrombina a ser glucada en situaciones de hiperglucemia, como la diabetes mellitus, y mostraban que la antitrombina glucada pierde su actividad anticoagulante⁹⁻¹⁹. Dado que la deficiencia funcional de este potente anticoagulante determina un elevado riesgo trombótico y vital^{20,21}, la pérdida de función

de antitrombina en la diabetes mellitus por glucación podría explicar las complicaciones trombóticas que presentan estos pacientes.

El objetivo de nuestro trabajo es determinar si la inactivación de la antitrombina por glucación se debe a cambios conformacionales asociados y si ésta podría ser relevante en las complicaciones trombóticas asociadas con la diabetes mellitus.

Por otra parte, el conocimiento de que la glucación representa la base molecular responsable de las principales complicaciones debidas a la hiperglucemia en los pacientes diabéticos, ha impulsado desde hace varias décadas la investigación de diferentes compuestos antiglucantes. Entre éstos, la aminoguanidina se ha mostrado como el más potente, capaz de atenuar el desarrollo de una gran cantidad de complicaciones vasculares asociadas con la diabetes mellitus en modelos animales^{3,22}. Sin embargo, ensayos clínicos en fase III han detectado efectos tóxicos adversos³. Ello ha propiciado que se realizaran intensos esfuerzos para buscar nuevos agentes seguros, de origen sintético o naturales. En este trabajo se ha pretendido evaluar el posible efecto antiglucante *in vitro* de diferentes sustancias, mediante la antitrombina como modelo en el que verificar su efecto protector.

Métodos

Glucación *in vitro* de la antitrombina

Se empleó antitrombina purificada procedente de concentrados terapéuticos comerciales (Kybernin P®, Aventis). La antitrombina se diluyó a concentraciones fisiológicas (150 µg/ml) en solución salina tamponada. Los ensayos de glucación también se realizaron sobre la forma latente de la antitrombina, preparada por incubación de antitrombina purificada según la metodología descrita previamente²³.

Además, se realizaron ensayos de glucación *in vitro* sobre la antitrombina plasmática de donantes sanos. La sangre se obtuvo por punción venosa, se anticoaguló con citrato e inmediatamente el plasma se separó por centrifugación a 1.200 rpm durante 30 min. El plasma obtenido se alicuotó y se congeló a -70 °C hasta el momento de su uso.

La glucación no enzimática se realizó empleando diferentes sustancias glucantes:

1. *Glucosa* (Sigma). Se realizaron estudios tiempo y dosis-respuesta. La dosis máxima de glucosa que se empleó fue de 100 mmol/l.

2. *Metilglioxal* (Sigma). Evaluamos el efecto de diferentes dosis y tiempos de incubación con este agente glucante (hasta 55 mmol/l).

Evaluación de sustancias con potencial antiglucante

Las moléculas estudiadas por su posible efecto protector de la glucación no enzimática de la antitrombina se seleccionaron por su potente efecto antiglucante, por ser caperuzas químicas que protegen la conformación nativa de diferentes proteínas²⁴ o por su demostrada capacidad de unirse a la

molécula. Así, nuestro estudio finalmente incluyó los siguientes grupos de sustancias:

- Poliaminas: espermina y espermidina, ambas analizadas en concentraciones de 50 mmol/l (Sigma).

- Polifenoles, de los que se analizó una batería de flavonoides representativa de los principales tipos estructurales: quercetina (10 mmol/l), catequina (10 mmol/l), rutina (10 mmol/l), rhoifolina (10 mmol/l), apigenina (2,5 mmol/l), genisteína (2,5 mmol/l) (todos amablemente cedidos por Furfural Española) y luteolina (2,5 mmol/l) (Aldrich Química).

- Aminoguanidina (50 mmol/l) (Sigma).

- Heparina (250 U/ml) (Rovi).

- Caperuzas químicas: betaína (250 mmol/l) (Sigma), glicerol (5%) (BDH); DMSO (5%) (SIGMA) y TMAO (200 mmol/l) (Sigma).

La evaluación del potencial antiglucante se realizó incubando durante 30 min el plasma con las diferentes sustancias antes comentadas, y posteriormente con metilglioxal (2,77 mmol/l) durante 60 min. Para cada una de las sustancias que demostraron un claro efecto protector sobre la antitrombina se realizaron estudios de respuesta dependiente de la dosis.

Determinación de los valores funcionales y antigénicos de la antitrombina

Los ensayos funcionales se realizaron con la evaluación de la capacidad inhibitoria antifactor X activado (anti-FXa) en presencia de la heparina que tiene la antitrombina. La cuantificación de esta actividad se realizó empleando FXa bovino y sustrato cromogénico de esta proteasa (Instrumentation Laboratory). Los valores antigénicos de antitrombina se determinaron mediante inmunodifusión (Laurell) y ELISA, mediante anticuerpos policlonales antitrombina de cabra (Sigma) y conejo (Dako), según el protocolo previamente descrito²⁵.

Evaluación de los cambios conformacionales de la antitrombina

Las diferentes variantes conformacionales de la antitrombina se estudiaron mediante diferentes técnicas electroforéticas. En primer lugar, se utilizaron geles de acrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con trabajos previos²³. También se emplearon sistemas electroforéticos no desnaturizantes (native-PAGE) en presencia o ausencia de urea, con pequeñas variaciones respecto al método descrito previamente²⁶. La utilización de urea (6 mmol/l) en geles no desnaturizantes permite diferenciar la antitrombina nativa (activa) de la antitrombina latente (inactiva)²⁷. La detección de la antitrombina se realizó mediante tinción con azul de coomassie cuando se empleó proteína purificada, y mediante *western-blot* en las muestras plasmáticas, según las indicaciones previamente publicadas²⁵.

Electroforesis bidimensional

La afinidad a la heparina de la antitrombina se evaluó mediante electroforesis bidimensional en presencia de heparina, de acuerdo con las condiciones establecidas previamente por nuestro grupo²⁵.

Evaluación del grado de glucación de la antitrombina en pacientes diabéticos

Tras informar de los objetivos y requerimientos de este estudio y obtener el consentimiento de los pacientes, nuestro estudio incluyó 101 pacientes diabéticos consecutivos que acudieron a la misma unidad de endocrinología durante el año 2004.

En todos ellos, se recogieron las variables sociodemográficas (edad y sexo) y los factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, hipercolesterolemia y hábito tabáquico). Se considera hipertensión arterial cuando la presión arterial sistólica es ≥ 160 mmHg y/o la presión arterial diastólica es ≥ 95 mmHg en, al menos, 2 determinaciones. La hipercolesterolemia se definió por valores de colesterol ≥ 240 mg/dl (6,17 mmol/l). El tabaquismo se define cuando se supera, en la actualidad o en el pasado, el consumo de 10 cigarrillos al día. También se recogió la incidencia de complicaciones microvasculares (nefropatía y retinopatía) y macrovasculares (cardiopatía isquémica-antecedentes de angor o infarto agudo de miocardio, o accidente cerebrovascular). Finalmente, se extrajo una muestra de sangre anticoagulada con citrato de cada paciente en ayunas a las 8 de la mañana, de la que inmediatamente se separaron el plasma (que se almacenó a -70 °C) y la fracción celular, de la que se obtuvo ADN genómico mediante un sistema comercial (REAL, España). Se determinaron los valores antigénicos y la actividad plasmática de la antitrombina en los pacientes. Como grupo control se empleó un *pool* de plasma de 100 sujetos sanos. Además, se determinaron en los pacientes los valores de glucemia en ayunas, los de hemoglobina glucosilada (HbA1c) y los polimorfismos genéticos protrombóticos más relevantes: el factor V Leiden y la mutación de la protrombina A20210G. Ningún paciente presentaba en el momento del estudio una enfermedad aguda ni estaba recibiendo tratamiento anticoagulante con heparina que pudiera afectar los estudios realizados sobre la antitrombina. El estudio tiene la limitación de no haber establecido un cálculo del tamaño de la muestra, debido básicamente a que se desconoce la variabilidad esperada y los elementos supuestamente implicados.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa informático NCSS versión 6.0.9. Se realizó un análisis descriptivo de las variables continuas mediante medidas de tendencia central (media) y medidas de dispersión (desviación estándar, mínimo, máximo). Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si las variables seguían una distribución normal. Para las variables continuas de distribución normal, la comparación de medias absolutas entre 2 grupos se realizó mediante la prueba de la *t* de Student. El análisis de las variables continuas de distribución asimétrica se realizó utilizando métodos no paramétricos: la prueba de la *U* de Mann-Whitney para la comparación de medias absolutas entre 2 grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de medias absolutas entre 3 o más grupos. Se ha considerado la significación estadística para un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

Glucación *in vitro* de antitrombina con metilglioxal y glucosa

La incubación de antitrombina purificada y plasmática con metilglioxal a una concentración de 5 mmol/l durante 30 min no modificó los valores antigénicos de la proteína, ni afectó de forma significativa a su tamaño molecular (fig. 1). Sin embargo, la glucación *in vitro* con metilglioxal redujo de manera significativa la actividad anti-FXa de la muestra (un 40% respecto a la actividad basal) (fig. 2). El estudio conformacional demostró que las 2 formas

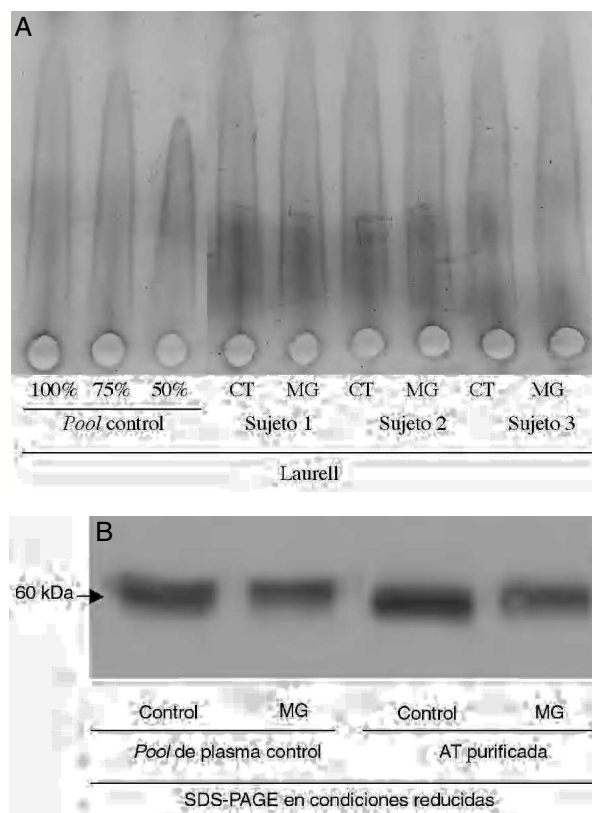


Figura 1. Efecto del metilglioxal (5 mmol/l durante 30 min) en los valores (A) y el tamaño (B) de la antitrombina (AT) plasmática y purificada. CT: control; MG: metilglioxal.

de antitrombina presentes en plasma y la antitrombina purificada (nativa y latente) experimentan ligeras variaciones electroforéticas (fig. 2). Cabe destacar que la incubación con metilglioxal provoca un aumento significativo de la antitrombina con baja afinidad por la heparina (fig. 2). Los efectos de la glucación *in vitro* de la antitrombina con metilglioxal son dependientes del tiempo y de la dosis de exposición. Como puede observarse en la figura 3, a las 3 h de incubación con 5 mmol/l de metilglioxal, la totalidad de la antitrombina tiene una baja afinidad a la heparina y carece de actividad anticoagulante. Similares resultados se obtienen si se incuba el plasma de sujetos sanos durante 60 min con mayores dosis de metilglioxal (hasta 55 mmol/l) (fig. 3). La incubación de estas muestras con glucosa provoca los mismos efectos que el metilglioxal, pero de forma mucho más lenta y moderada. Así, la mayor dosis de glucosa analizada (100 mmol/l) requiere incubaciones de 1 semana para conseguir un efecto similar al que ejercen 5 mmol/l de metilglioxal en 30 min (fig. 2).

Figura 2. Efecto de la glucación no enzimática con metilglioxal (MG) (5 mmol/l durante 30 min) o con glucosa (GLU) (100 mmol/l durante 1 semana) sobre: A) la actividad anti-FXa; B) las estructuras conformacionales, y C) la afinidad por la heparina de la antitrombina. CT: control; MG: metilglioxal; Nat: forma nativa; Lat: forma latente. Se observan resultados similares si se emplea antitrombina purificada.

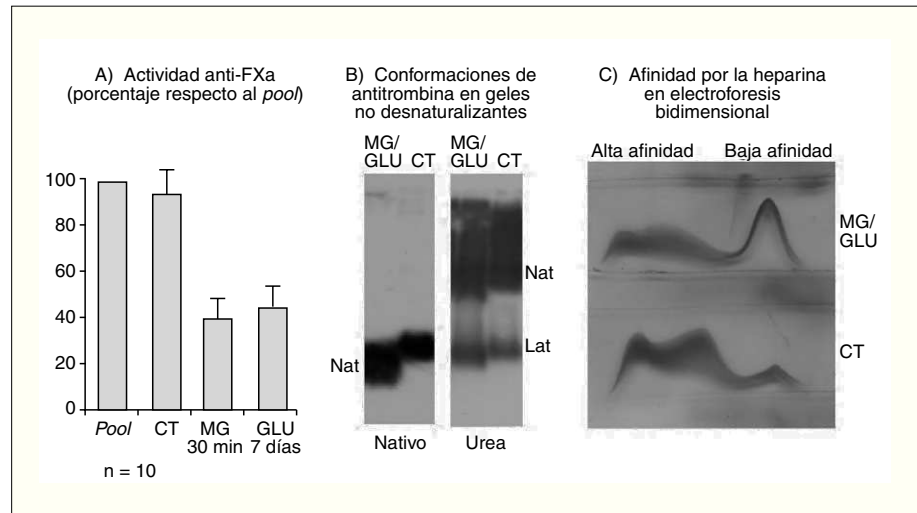
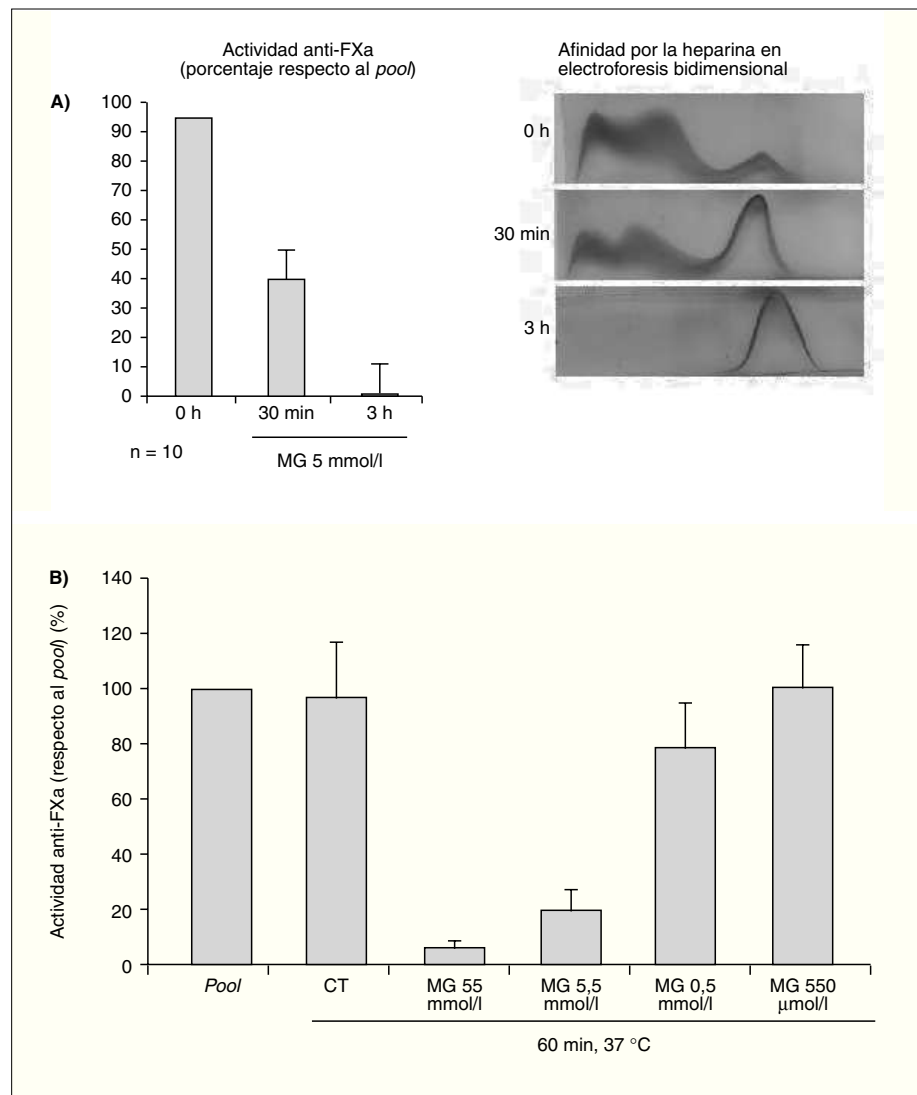


Figura 3. Efecto en la antitrombina plasmática de incubaciones prolongadas (A) o con diferentes dosis de metilglioxal (MG) (B). CT: control; MG: metilglioxal.



Evaluación del papel protector de diferentes sustancias sobre la actividad de la antitrombina ante el efecto glucante del metilglioxal

Nuestro estudio aporta un modelo sencillo en el que evaluar el posible efecto protector de diferentes agentes con potencial actividad antigluicante: el análisis de la actividad anti-FXa de plasmas tratados *in vitro* con metilglioxal. Nuestros resultados mostraron que la aminoguanidina, la heparina y la

catequina tienen un potente efecto protector de la actividad de la antitrombina tras la incubación con metilglioxal (2,77 mmol/l durante 60 min), que además es dependiente de la concentración (fig. 4). La IC50 de estas 3 sustancias queda reflejada en la figura 4. La rutina y espermina ejercieron un discreto efecto protector sobre la antitrombina, mientras que el resto de sustancias evaluadas no protegen a la antitrombina (fig. 4). De forma relevante,

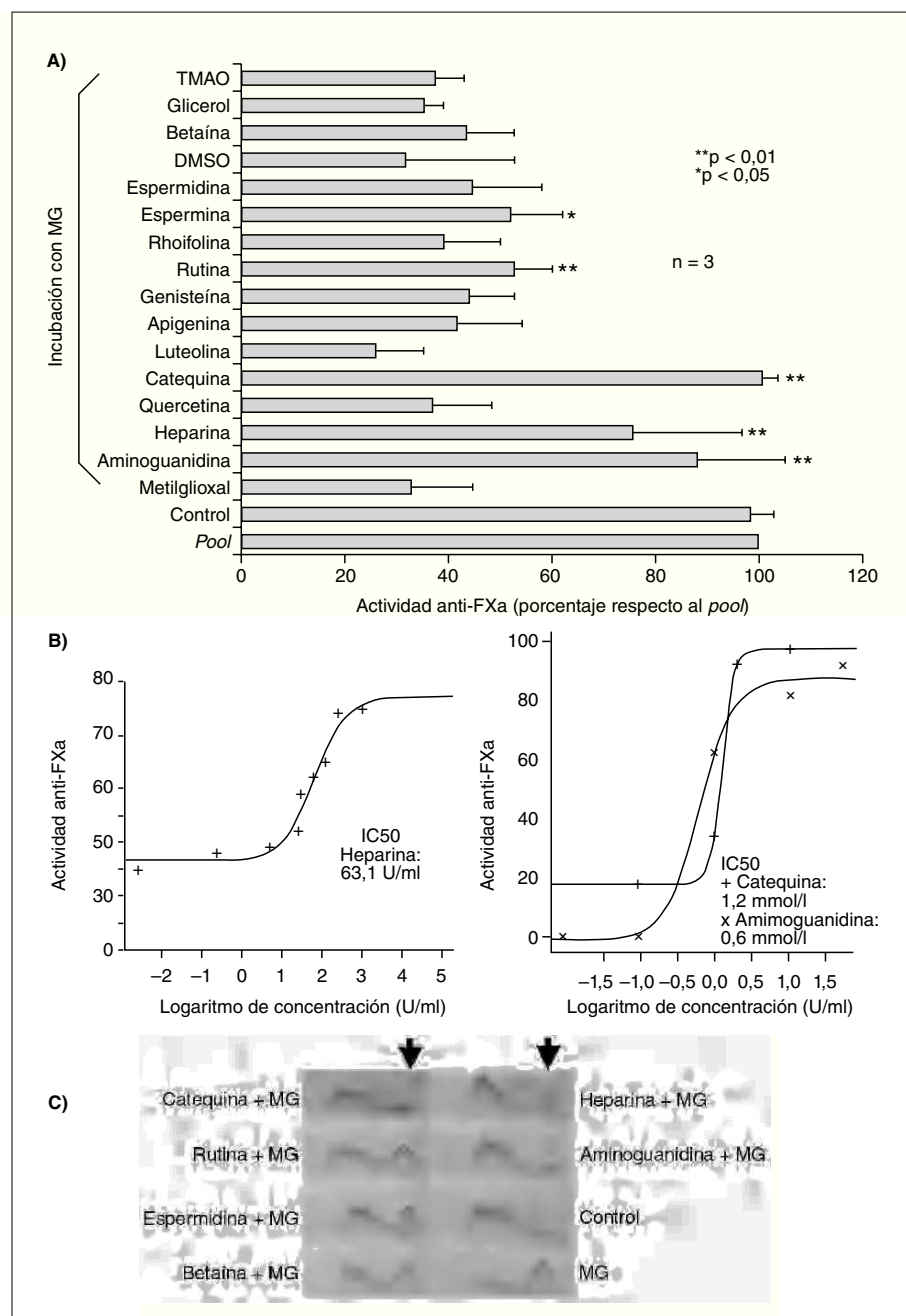


Figura 4. A) Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad anticoagulante de la antitrombina incubada con metilglioxal (MG) (2,7 mmol/l durante 60 min). La comparación estadística se realiza con las muestras tratadas sólo con metilglioxal. B) Evaluación de la IC50 mediante el estudio dependiente de la concentración de las sustancias con mayor capacidad antigluicante sobre la antitrombina. C) Efecto sobre la transición de antitrombina a formas de baja afinidad por la heparina (flecha) que inducen diferentes sustancias en presencia de MG.

las sustancias protectoras impiden la transición de la antitrombina a formas con menor afinidad por la heparina que induce el metilglioxal (fig. 4).

Evaluación del grado de glucación de antitrombina en pacientes diabéticos

Las características clinicobiológicas de los pacientes diabéticos estudiados aparecen en la tabla 1. De los 101 diabéticos, 35 presentaban diabetes mellitus tipo 1 (un 34,6%) y 66 tipo 2 (un 65,4%). La media de tiempo de evolución de la diabetes en los 101 pacientes fue de 13,4 años (rango, 0,5-46). En su conjunto, los pacientes diabéticos presentaron valores funcionales y antigénicos de antitrombina inferiores ($87,8\% \pm 16,7$ y $80,7\% \pm 23,5$, respectivamente) a los presentes en un *pool* de plasma de 100 sujetos sanos (100%) (tabla 2). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes al evaluar los parámetros relacionados con el control de la glucemia. Al estratificar a los pacientes en relación con los valores de HbA1c (≤ 7 frente a $> 7\%$), de acuerdo con los valores de relevancia clínica que recoge un reciente trabajo²⁸, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad anticoagulante o los valores antigénicos de antitrombina (tabla 2). Tampoco los valores de glucemia en ayunas se asocian con diferencias significativas en la función anticoagulante de la antitrombina de los pacientes incluidos en este estudio (tabla 2).

Discusión

En la diabetes mellitus se ha establecido una relación causal entre el control glucémico y el desarrollo de complicaciones microvasculares y macrovasculares, tanto en estudios realizados en humanos como en modelos animales^{29,30}. De hecho, algunos estudios epidemiológicos retrospectivos sugieren que la nefropatía y la retinopatía se presentan con mayor probabilidad en pacientes con un mal control glucémico. El riesgo es mayor si el valor de HbA1c se mantiene por encima del 10%, frente a un menor riesgo en pacientes en los que la HbA1c se mantiene por debajo del 8,5%, según se ha confirmado en estudios multicéntricos³¹, lo cual demuestra que un control estricto de la glucemia permite retrasar el comienzo de las complicaciones microvasculares, sobre todo en la diabetes mellitus tipo 1, y también puede proteger de la aparición de complicaciones macrovasculares en la diabetes mellitus tipos 1 y 2^{32,33}. En el presente trabajo se ha pretendido destacar la influencia que podría ejercer la antitrombina en el estado protrombótico de

Tabla 1. Características clinicobiológicas de los pacientes diabéticos estudiados

Características clinicobiológicas	Pacientes diabéticos (n = 101)
Edad (años): media (DE)	52,8 \pm 16,9
Sexo: V (%) / M (%)	51 (50,5) / 50 (49,5)
Glucemia: media (DE)	164,1 \pm 68,2
HbA1c: media (DE)	7,5 \pm 1,4
Hipertensión (%)	57 (56,4)
Hipercolesterolemia (%)	48 (47,5)
Tabaquismo (%)	35 (34,7)
Factor V Leiden (%)	4 (4)
Protrombina A20210G (%)	1 (1)
Complicaciones macrovasculares (%)	31 (30,7)
Complicaciones microvasculares (%)	46 (45,5)

V: varón; M: mujer; DE: desviación estándar.

la diabetes mellitus. La relevancia de la antitrombina en el control de la hemostasia podría explicar en parte este estado hipercoagulable. La pérdida de actividad de esta serpina en los pacientes diabéticos, descrita previamente y confirmada en nuestro estudio, podría estar asociada con trastornos de glucación no enzimática, como se había sugerido⁹⁻¹⁹. Pero el mecanismo asociado a tal efecto no ha sido completamente clarificado. La antitrombina, como el resto de serpinas, se caracteriza por la flexibilidad de su estructura molecular; característica necesaria para el eficaz cumplimiento de su función inhibitoria⁸. No obstante, esta flexibilidad la hace especialmente sensible a diferentes factores que podrían modificar su conformación nativa⁸. De

Tabla 2. Valores funcionales y antigénicos de antitrombina en los pacientes diabéticos evaluados, estratificados según los valores de HbA1c y glucemia

	Valores funcionales AT (porcentaje respecto al <i>pool</i>)	Valores antigénicos AT (porcentaje respecto al <i>pool</i>)
Total (n = 101)	87,8 \pm 16,7	80,7 \pm 23,5
HbA1c $\leq 7\%$ (n = 48)		
media \pm DE	84,0 \pm 16,2	79,4 \pm 27,1
HbA1c $> 7\%$ (n = 53)		
media \pm DE	91,2 \pm 16,4	81,9 \pm 20,0
p	0,143	0,598
Glucemia en ayunas ≤ 150 mg/dl (n = 52)		
media \pm DE	88,6 \pm 17,4	84,5 \pm 23,4
Glucemia en ayunas > 150 mg/dl (n = 49)		
media \pm DE	87,0 \pm 15,9	76,8 \pm 23,3
p	0,645	0,102

DE: desviación estándar.

hecho, la transición de la forma nativa a la latente, con la consiguiente pérdida de actividad, se produce en condiciones fisiológicas lentamente^{8,23,25,27}. Por ello, parecía razonable sugerir que la glucación no enzimática de la antitrombina podría afectar a la estabilidad conformacional de esta proteína, modificando su capacidad anticoagulante. Sin embargo, los experimentos de glucación *in vitro* realizados, sugieren que este mecanismo no provoca un aumento de la forma latente ni la aparición de polímeros. La glucación no enzimática, tanto de la antitrombina plasmática como de la purificada, sólo provoca una ligera alteración electroforética que afecta tanto a la forma nativa como a la latente. La presencia de una banda difusa en ambas posiciones podría representar una heterogeneidad de moléculas con diferentes grados de glucación. A pesar de no tener grandes consecuencias conformacionales, la glucación afecta de forma significativa a la afinidad de la antitrombina por la heparina. Las formas de antitrombina glucadas tienen baja afinidad por la heparina, como se ha comprobado mediante electroforesis bidimensional. Este cambio explica la deficiencia funcional asociada con la glucación. Así, la proteína glucada, al no unirse a la heparina, apenas tiene un potencial inhibitorio anticoagulante³⁴. La justificación molecular de este proceso radica en la riqueza, en residuos lisina y arginina de esta serpina, y la localización en regiones clave en su funcionalidad. La glucación de las lisinas y argininas localizadas en el sitio de unión a la heparina podría impedir una correcta unión de la molécula de antitrombina al pentasacárido esencial de la heparina. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la incubación de la antitrombina con heparina reduce significativamente el efecto del metilglioxal y, por tanto, protege eficazmente la actividad de la molécula en situaciones de glucación no enzimática. Por consiguiente, nuestros datos sugieren un nuevo papel anticoagulante de la heparina. Además de potenciar la actividad inhibitoria de la antitrombina, la heparina protege a esta molécula de la inactivación funcional causada por procesos de glucación no enzimática. Este proceso podría ser especialmente relevante para la forma β de la antitrombina, una variante minoritaria (5-10%) que se diferencia de la forma α por la ausencia de la glucosilación en el residuo asparragina 135³⁵. Es interesante constatar que la forma β de la antitrombina tiene una afinidad por la heparina muy elevada. Además, 2 notables experimentos^{36,37} sugieren que la forma β de la antitrombina podría desempeñar un papel importante en el control de la trombosis en la superficie endotelial, especial-

mente en la circulación arterial. De esta forma, el proceso de glucación y la pérdida de afinidad por la heparina asociada podrían ser especialmente relevantes para la forma β de antitrombina y podrían asociarse con las complicaciones macrovasculares asociadas con la diabetes mellitus. Desafortunadamente, es necesario desarrollar sistemas simples y reproducibles que permitan identificar, cuantificar y caracterizar la forma β de esta serpina para demostrar este efecto *in vitro* y en pacientes con diabetes.

A pesar del claro y potente efecto *in vitro* de la glucación no enzimática sobre la antitrombina, los resultados que observamos en los pacientes diabéticos no son tan concluyentes. En primer lugar, los pacientes tienen una ligera deficiencia de valores funcionales (un 87,8%) respecto a un *pool* de 100 sujetos sanos (el 100%), de forma similar a lo descrito previamente^{9,19}. Sin embargo, nosotros observamos un ligero déficit antigénico y funcional (por tanto, una ligera deficiencia tipo I). Por el contrario, ciertos estudios previos, realizados con un escaso número de sujetos, detectan menores valores funcionales pero no antigénicos^{9,11,14}. Es necesario realizar estudios con mayor número de pacientes para verificar qué tipo de déficit de antitrombina presentan los pacientes diabéticos. Nuestro estudio tampoco detecta diferencias sustanciales en los valores de antitrombina en los pacientes según sus valores de HbA1c y glucemia. El lento y débil efecto glucante de la glucosa y la reducida vida media de la antitrombina³⁸ explicarían los resultados obtenidos.

Otro aspecto importante de nuestro trabajo es el estudio de agentes protectores de la glucación. Uno de los agentes más estudiados es la aminoguanidina, que previene la formación de AGE bloqueando la degradación de los productos Amadori³⁹. Un trabajo reciente muestra que la aminoguanidina ejerce un potente efecto protector de la glucación no enzimática de la antitrombina⁴⁰, resultado que nosotros confirmamos en el presente estudio. Por el contrario, se ha sugerido que otros agentes podrían ser antiglucantes y protectores de la actividad de la antitrombina en presencia de metilglioxal, como las poliaminas espermina y espermidina⁴¹, pero tienen un escaso efecto protector, o bien no protegen en nuestros experimentos. Es necesario realizar estudios adicionales para aclarar el efecto de estas sustancias. Sin embargo, nuestro estudio identifica un flavonoide con potente efecto protector de la actividad de la antitrombina con metilglioxal: la catequina. Este dato se ve apoyado por el mismo efecto protector que ejercen los extractos de plantas con

alto contenido en flavonoides⁴⁰. El resto de flavonoides analizados apenas tienen efectos significativos. Nuestros resultados parecen descartar que el efecto de la catequina pueda deberse a su capacidad inhibitoria de formación de AGE⁴², ya que otros flavonoides con similar efecto anti-AGE, como la apigenina⁴², apenas protegen a la antitrombina (fig. 4). Además, el tiempo de los experimentos (30-60 min) permite una escasa formación de AGE, por lo que el efecto nocivo del metilglioxal se debe exclusivamente a su capacidad reactiva con los residuos lisina y arginina de las proteínas. Estos datos, junto al hecho de que ambas sustancias tienen un efecto similar al observado con heparina (fig. 4), podrían sugerir un efecto directo de la catequina sobre la glucación inducida por metilglioxal en la antitrombina, especialmente en el sitio de unión a heparina. En apoyo de nuestra hipótesis se puede citar que recientemente se ha caracterizado un derivado sulfatado de la catequina (la epicatequina sulfatada), que es capaz de unirse al dominio de unión a la heparina de la antitrombina, lo que potencia su actividad anticoagulante^{43,44}. Nuestros resultados confirman que ciertas sustancias, como heparina, aminoguanidina y catequina, pueden proteger la funcionalidad de moléculas tan relevantes como la antitrombina ante procesos de glucación.

Bibliografía

- Wahl PW, Savage PJ, Psaty BM, Orchard TJ, Robbins JA, Tracy RP. Diabetes in older adults: comparison of 1997 American Diabetes Association classification of diabetes mellitus with 1985 WHO classification. *Lancet*. 1998;352:1012-5.
- Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diab Compl*. 2001;15:44-54.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44:129-46.
- Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Progress in Hormonal Research*. 2001;56:1-21.
- Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanism. *Cardiovasc Diabetol*. 2002;1:1.
- Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*. 1995;46:223-34.
- Dukic-Stefanovic S, Schinzel R, Riederer P, Munch G. AGEs in brain ageing: AGE-inhibitors as neuroprotective and anti-dementia drugs? *Biogerontology*. 2001;2:19-34.
- Corral J, Vicente V. Trombosis y enfermedad conformacional. *Haematologica*. 2003;88:243-57.
- Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Stante A, Consoli G, Dello Russo P, et al. Daily rapid glucose variations may condition antithrombin III biologic activity but not its plasma concentration in insulin-dependent diabetes. A possible role for labile non-enzymatic glycation. *Diabetes Metabolism*. 1987;13:16-9.
- Banerjee R N, Sahni A L, Kumar V, Arya M. Antithrombin III deficiency in maturity onset diabetes and atherosclerosis. *Thromb Diath Haemorrh*. 1974;31:339-45.
- Ceriello A, Dello Russo P, Zuccotti C, Floria A, Nazzaro S, Pietrantonio C, et al. Decreased antithrombin III activity in diabetic patients may be due to nonenzymatic glycosylation. A preliminary report. *Thromb Haemost*. 1983;50:633-4.
- Busby TF, Ingham KC. Thermal stabilization of antithrombin III by sugars and sugars derivatives and the effects of nonenzymatic glycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 1984;799:80-9.
- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Inhibition of heparin-catalyzed human antithrombin III activity by nonenzymatic glycosylation: possible role in fibrin deposition in diabetes. *Diabetes*. 1984;33:532-5.
- Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Consoli G, Stante A, Dello Russo P, et al. Induced hyperglycemia alters antithrombin III activity but not its plasma concentration in healthy normal subjects. *Diabetes*. 1987;36:320-3.
- Villanueva GB, Allen N. Demonstration of altered antithrombin III activity due to nonenzymatic glycosylation at glucose concentration expected to be encountered in severely diabetic patients. *Diabetes*. 1988;37:1103-7.
- Sakurai T, Boissel JP, Bunn F. Non-enzymatic glycation of antithrombin III *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 1988;964:340-7.
- Ceriello A, Marchi E, Barbanti M, Milani MR, Giugliano D, Quatraro A, et al. Non-enzymatic glycation reduces heparin cofactor II anti-thrombin activity. *Diabetologia*. 1990;33:205-7.
- Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Stante A, Consoli G, Dello Russo P, et al. Heparin preserves antithrombin III biological activity from hyperglycemia-induced alterations in insulin-dependent diabetes. *Haemostasis*. 1986;16:458-64.
- Ducrocq R, Bachour H, Belkhdja R, Berriche S, Elion J. Evidence for nonenzymic glycation of antithrombin III in diabetic patients. *Clin Chem*. 1985;31:338-9.
- Bayton T, Lane D. Antithrombin mutation data base. Department of Haematology. Imperial College Faculty of Medicine. Charing Cross Hospital Campus. Hammersmith. London 2003. Disponible en: <http://www.med.ic.ac.uk/divisions/7/antithrombin/>
- Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K, Nakayama Y, Takagi A, Suzuki M, et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest*. 2000;106:873-8.
- Clark CM JR, Lee DA. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995;332:1210-7.
- Zhou A, Huntington JA, Carrell RW. Formation of the antithrombin heterodimer *in vivo* and the onset of thrombosis. *Blood*. 1999;94:3388-96.
- Anjum F, Rishi V, Ahmad F. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1476:75-84.
- Corral J, Rivera J, Martínez C, González-Conejero R, Miñano A, Vicente V. Detection of conformational transformation of antithrombin in blood with crossed immunoelectrophoresis: new application for a classical method. *J Lab Clin Med*. 2003;142:298-305.
- Bruce D, Perry DJ, Borg JY, Carrell RW, Wardell MR. Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (197 Asn-Asp). *J Clin Invest*. 1994;94:2265-74.
- Carrell RW, Huntington JA, Mushunje A, Zhou A. The conformational basis of thrombosis. *Thromb Haemost*. 2001;86:14-22.
- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28:4S-36S.
- Vlassara H. Protein glycation in the kidney: role in diabetes and aging. *Kidney Int*. 1996;49:1795-804.
- Kuusisto J, Mykkanen L, Pyorala K, Laakso M. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes*. 1994;43:960-7.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-86.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352:837-53.
- Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillion DJ, Backlund JY, et al. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2003;348:2349-52.
- Olson ST, Bjork I. Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. *Semin Thromb Haemost*. 1994;20:373-409.
- McCoy AJ, Pei XY, Skinner R, Abrahams JP, Carrell RW. Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin.

- rombin's heparin affinity and activity. *J Mol Biol.* 2003;326:823-33.
36. Frebelius S, Isaksson S, Swedenborg J. Thrombin inhibition by antithrombin III on the subendothelium is explained by the isoform AT β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1292-7.
37. Witmer MR, Hatton MW. Antithrombin III-beta associates more readily than antithrombin III-alpha with uninjured and de-endothelialized aortic wall *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:530-9.
38. Bock SC. Antithrombin III and heparin cofactor II. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, editors. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 321-33.
39. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986;232:1629-32.
40. Gugliucci A, Menini T. The botanical extracts of *achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sci.* 2002;73:279-92.
41. Gugliucci A, Menini T. The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci.* 2003;72:2603-16.
42. Matsuda H, Wang T, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg Med Chem.* 2003;11:5317-23.
43. Gunnarsson GT, Desai UR. Designing small, nonsugar activators of antithrombin using hydrophobic interaction analogues. *J Med Chem.* 2002;45:1233-43.
44. Gunnarsson GT, Desai UR. Interaction of designed sulfated flavonoids with antithrombin: lessons on the design of organic activators. *J Med Chem.* 2002;45:4460-70.