



Original/Síndrome metabólico

Disfuncionalidad antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en pacientes diabéticos descompensados

Fernanda Awad¹, Susana Contreras-Duarte¹, Patricia Molina¹, Verónica Quiñones¹, Valentina Serrano¹, Eduardo Abbott², Alberto Maiz¹, Dolores Busso¹ y Attilio Rigotti^{1,3}

¹Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo. ²Departamento de Medicina Interna. ³Centro de Nutrición Molecular y Enfermedades Crónicas. Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago. (Chile).

Resumen

Introducción: las lipoproteínas de alta densidad (HDL) tienen un importante efecto protector cardiovascular mediado por su función durante el transporte reverso del colesterol, así como por otras actividades, incluyendo una significativa acción antiinflamatoria y antioxidante. La funcionalidad antiinflamatoria y antioxidante de las HDL está alterada en los pacientes diabéticos crónicos estables, aunque no existe mayor información en caso de una crisis hiperglicémica.

Objetivo: determinar si durante un estado de descompensación diabética aguda las partículas de HDL exhiben un deterioro de su función antioxidante y si esta logra recuperarse una vez resuelto el cuadro agudo.

Métodos: la actividad antioxidante de las HDL se midió mediante un ensayo de fluorescencia in vitro en muestras plasmáticas de pacientes diabéticos con descompensación aguda obtenidas tanto al ingreso, alcanzada la resolución intrahospitalaria del evento agudo, así como en un control ambulatorio post-hospitalización. Como comparación, se analizaron partículas de HDL de algunos sujetos sanos como condición control.

Resultados: la actividad antioxidante de las HDL en pacientes con descompensación diabética aguda fue significativamente menor a la observada en el grupo control sano, y esta se fue recuperando progresivamente hasta normalizarse en el momento del control ambulatorio. La crisis hiperglicémica también demostró una baja actividad plasmática de la enzima antioxidante paraoxonasa-1, la cual aumentó significativamente en el control ambulatorio.

Conclusión: las partículas de HDL presentes en pacientes con una descompensación diabética aguda presentan

ANTIOXIDANT DYSFUNCTIONALITY OF HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS (HDL) IN DECOMPENSATED DIABETIC PATIENTS

Abstract

Introduction: high density lipoproteins (HDL) have important cardiovascular protective effects mediated by their role in reverse cholesterol transport as well as other functional activities, including significant anti-inflammatory and antioxidant properties. It has been shown that HDL anti-inflammatory and antioxidant functions are defective in metabolically stable diabetic patients; however they have not been evaluated during a hyperglycemic crisis.

Aim: to determine the antioxidant activity of HDL during a severe diabetic decompensation and to analyze whether this function is restored after resolution of the acute event.

Methods: the antioxidant activity of HDL was measured in vitro by a fluorescent assay in plasma samples obtained from diabetic patients with acute metabolic decompensation at admission, recovery within the hospital and follow-up in ambulatory care. As a comparison, HDL particles from some healthy subjects were used as controls.

Results: the HDL antioxidant function was significantly reduced in patients during an acute diabetic decompensation compared with the control group, and was gradually restored reaching normal values during the ambulatory follow-up. Hyperglycemic crisis also showed low plasma paraoxonase-1 activity, which increased significantly during at follow-up.

Conclusion: HDL particles isolated from acute diabetic decompensated patients exhibit a significantly and

Correspondencia: Attilio Rigotti.

Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo.
Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica.
Marcoleta #367 - interior, 4to Piso, Santiago, CP 8330024 (Chile).
E-mail: arigotti@med.puc.cl.

Recibido: 5-VI-2015.

Aceptado: 10-VI-2015.

una reducción significativa y reversible de su capacidad antioxidante, probablemente como consecuencia de una alteración en la actividad de la paraoxonasa-1.

(*Nutr Hosp.* 2015;32:1131-1138)

DOI:10.3305/nh.2015.32.3.9340

Palabras clave: *Lipoproteínas de alta densidad. Diabetes mellitus. Crisis hiperglicémica. Capacidad antioxidante de HDL. Paraoxonasa-1.*

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica multifactorial que se caracteriza por un estado de hiperglicemia debido a deficiencia en la secreción de la insulina o resistencia a su acción periférica, lo que determina un estado de hiperglicemia crónica que conlleva daño micro- como macrovascular en diferentes tejidos¹. Las personas diabéticas presentan un riesgo cardiovascular aterosclerótico elevado, por lo que la DM es una importante condición de riesgo de enfermedad coronaria². Dentro de los múltiples elementos etiopatogénicos que explican la mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular en pacientes diabéticos se encuentran las alteraciones observadas en el perfil lipídico y lipoproteico plasmáticos, los cuales constituyen un importante factor que favorece el daño aterogénico.

La dislipidemia aterogénica de la DM incluye la acumulación de partículas de LDL pequeñas y densas, el aumento de los niveles de triglicéridos y la disminución de los niveles y de la funcionalidad de las partículas HDL³. Además, los pacientes diabéticos cursan con un estado de inflamación y estrés oxidativo subclínico que se traduce en aumento de marcadores inflamatorios en forma permanente, tales como la proteína C reactiva (PCR), el amiloide sérico A (SAA), la ceruloplasmina, la fosfolipasa A2 y algunas interleuquinas⁴. Por otro lado, las LDL oxidadas inducen la liberación de mediadores inflamatorios derivados del endotelio y la expresión de moléculas de adhesión, acciones que generalmente son inhibidas por las HDL, las cuales de esta forma –junto con el transporte reverso de colesterol– cumplen su función protectora frente al desarrollo de la aterosclerosis⁵. Sin embargo, durante eventos inflamatorios agudos, tales como en pacientes sometidos a cirugía cardíaca o en modelos experimentales de inflamación aguda (e.g., inyecciones sucesivas de aceite de croton en conejos o posterior a una infección por influenza tipo A en ratones), se ha demostrado que las HDL no solamente pierden su acción como partículas anti-inflamatorias sino que adquieren un perfil pro-inflamatorio⁶. La acumulación de factores pro-inflamatorios en la circulación sistémica provoca el desplazamiento de componentes básicos de las HDL como la apolipoproteína A-I (apo A-I) y una disminución de los niveles u actividad de enzimas como la lecitina:colesterol aciltransferasa, la proteína transportadora de ésteres de colesterol, la paraoxonasa-1 (PON-1), la

reversibly low antioxidant capacity, which is probably due to a reduced paraoxonase-1 activity.

(*Nutr Hosp.* 2015;32:1131-1138)

DOI:10.3305/nh.2015.32.3.9340

Key words: *High density lipoproteins. Diabetes mellitus. Hyperglycemic crisis. Antioxidant capacity of HDL. Paraoxonase-1.*

acetil-hidrolasa del factor activador de plaquetas y la glutatión peroxidasa. Estas modificaciones en la composición de las HDL tienen efectos sobre sus diversas funciones, tales como el transporte reverso de colesterol y las actividades anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-agregante plaquetaria, explicando en gran parte un cambio hacia un perfil menos ateroprotector^{7,8}.

Si bien esta alteración funcional de las partículas de HDL ha sido estudiada en pacientes diabéticos en condición crónica y con un aceptable control metabólico⁹, no existe información disponible sobre cambios en la actividad funcional de las HDL durante episodios agudos de descompensación glicémica en la DM. El objetivo de este trabajo fue determinar si durante una crisis hiperglicémica existe alteración en la actividad funcional antioxidante de las HDL, y si esta puede ser revertida una vez resuelto el cuadro agudo.

Materiales y Métodos

Pacientes y toma de muestras

Los sujetos analizados en este trabajo correspondieron a pacientes que ingresaron con el diagnóstico de crisis hiperglicémica (cetoacidosis diabética (CAD) o síndrome hiperglicémico hiperosmolar (SHH) y que fueron manejados de manera protocolizada en la Unidad de Tratamiento Intermedio Médico-Neurológico (UTIMN) del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Así, se reclutaron 13 pacientes que cumplieron con criterios de inclusión y exclusión predefinidos (Tabla I) y con el diagnóstico de crisis hiperglicémica por CAD o SHH según los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA)¹ al momento del ingreso. Un caso de este estudio fue ingresado en dos oportunidades por cuadros independientes de descompensación diabética y sus datos fueron analizados como eventos separados.

Los criterios de resolución del cuadro de descompensación aguda después del tratamiento de los pacientes diabéticos –según el protocolo estandarizado– fueron los siguientes: glicemia <200 mg/dl juntos con dos de los tres siguientes criterios: pH >7,3, bicarbonato >18 mEq/L o gap aniónico <12 para cetoacidosis diabética o glicemia <300 mg/dl, osmolaridad plasmática <320 mOsm/L y recuperación del estado de conciencia para síndrome hiperglicémico hiperosmolar.

Antes de ser incluidos en el protocolo, todos los pacientes o sus familiares firmaron un consentimiento informado y voluntario de participación en el estudio. Todos los protocolos fueron revisados y aprobados por el Comité Ético Científico en Investigación de la Escuela de Medicina previo a la realización de los estudios y cumplieron con los criterios de la Declaración de Helsinki.

En relación al muestreo sanguíneo, se tomaron muestras de sangre venosa periférica, tanto al ingreso a la Unidad de Tratamiento Intermedio (<6 h de la consulta inicial) como al momento de la resolución del cuadro agudo de descompensación dentro del hospital. En algunos casos, una tercera muestra fue obtenida en un control ambulatorio realizado entre 3-6 meses post-alta hospitalaria. Adicionalmente, se tomaron muestras sanguíneas de siete personas sanas voluntarias (edad entre 25-50 años, sin patología médica conocida aguda o crónica ni uso de fármacos en forma reciente o permanente) como controles para comparación con los resultados obtenidos en pacientes diabéticos. Todas las muestras de sangre fueron mantenidas refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento posterior en el laboratorio.

Procesamiento y conservación de las muestras de sangre

La sangre total fue centrifugada para separar el plasma de las células sanguíneas. El plasma fue conservado a 4°C en una solución de sacarosa al 10% para preservar la funcionalidad de las partículas de HDL durante su aislamiento.

Una alícuota de 200 µl de plasma fresco fue utilizada para la separación de lipoproteínas mediante cromatografía de filtración (*fast protein liquid chromatography* (FPLC)) en una columna de exclusión molecular (Superose-6 10/300 GL, GE Healthcare Life Sciences) usando como solución de elución NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8 a flujo constante de 9 ml/h. Los primeros 15 ml fueron descartados para luego recuperar las siguientes 40 fracciones (300 µl cada una) donde eluyen las lipoproteínas plasmáticas. La concentración de colesterol en cada una de las fracciones obtenidas fue determinada mediante el método enzimático colorimétrica de Allain et al. descrito previamente¹⁰. Estos datos fueron utilizados para caracterizar el perfil de lipoproteínas de cada uno de los pacientes. Una segunda alícuota de cada paciente fue sometida a FPLC en idénticas condiciones, y las fracciones conteniendo las partículas de HDL (fracción 25 a 40) fueron conservadas a -20°C en una solución de sacarosa al 10%. El plasma restante fue alicuotado y conservado inmediatamente a -20°C para posteriores ensayos bioquímicos.

Determinación de la funcionalidad antioxidante de las HDL

Las fracciones que contenían las partículas de HDL fueron descongeladas a 4°C, juntadas en un *pool* único

y concentradas mediante centrifugación a 4.000 g en tubos de ultrafiltración Amicon Ultra-4 Millipore con un poro de 10 kDa (Merck) hasta alcanzar un volumen final de 250-500 µl en cada muestra. Finalmente, se determinó la concentración de proteínas en cada pool de HDL mediante el método enzimático de Lowry¹¹.

La capacidad antioxidante de las HDL fue determinada según el protocolo previamente reportado por Navab y cols¹². Brevemente, se incubó 0,025 mg/ml de 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-fosfatidilcolina oxidada (PAPCox) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) con 0,02 mg/ml de diclorofluoresceína (DCF) (Molecular Probes, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Se determinó la señal fluorescente basal generada por interacción de estos dos compuestos en ausencia y en presencia de las partículas de HDL (10 µg proteína/ml de volumen final). La fluorescencia fue detectada mediante un espectrofluorímetro a longitudes de excitación/emisión de 530/485 nm.

La actividad funcional antioxidante de las partículas de HDL se expresó como la razón entre la fluorescencia en presencia de HDL y la señal basal determinada exclusivamente por DCH/PAPCox, sin la adición de HDL. En este ensayo, una razón de fluorescencia <1.0 indica una actividad anti-oxidante de las HDL, con un valor más bajo reflejando una mayor capacidad antioxidante, mientras que una razón >1.0 refleja una actividad pro-oxidante de las HDL.

Determinación de actividad de paraoxonasa-1 sanguínea

La actividad de PON-1 fue determinada mediante un ensayo comercial de tipo fluorométrico (excitación/emisión máxima 360/450 nm) según instrucciones del fabricante (Enzchek Paraoxonase, Molecular Probes, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Este ensayo permite determinar la actividad organofosfatasa de PON-1 a través de la cuantificación de la hidrólisis a un análogo fluorogénico organofosfato. La tasa de hidrólisis fue monitoreada a 37°C durante 60 minutos y la mezcla del ensayo incluyó: 50 µl de buffer de reacción, 10 µl de cada muestra de suero de los pacientes y 50 µl del sustrato de paraoxonasa-1. La actividad de PON-1 se expresó como unidades de fluorescencia relativa (UFR) por minuto en 10 µl de suero.

Análisis Estadístico

Para analizar la diferencia global entre la funcionalidad antioxidante de las HDL de los pacientes al ingreso, al momento de resolución del evento agudo y del control ambulatorio y de los sujetos controles, se utilizó test de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. El análisis de la significancia en las diferencias entre los datos bioquímicos obtenidos al ingreso versus el momento de la resolución del evento o el control ambulatorio se realizó mediante el test pareado de Wilcoxon. El cambio gradual en la actividad antioxidante de

los pacientes posterior a la resolución del cuadro agudo se evaluó mediante análisis de correlación por rango de Spearman para la fluorescencia obtenida en las muestras de HDL de los pacientes al ingreso, durante la resolución y en el control ambulatorio. El análisis estadístico comparativo entre los datos bioquímicos de los pacientes en el control ambulatorio versus los controles sanos se realizó mediante el test no pareado de Mann Whitney. Los tests de Pearson y de regresión lineal simple fueron aplicados para el análisis de correlaciones entre los datos clínico-bioquímicos y la función antioxidante de las HDL al ingreso o en el momento de la resolución del evento agudo. La diferencia entre la actividad de la paraoxonasa-1 al ingreso y en el control ambulatorio fue analizada mediante el test pareado de Wilcoxon.

En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando resultó un valor de $p < 0,05$. El programa computacional utilizado para realizar los análisis estadísticos fue *GraphPad Prism 6*.

Resultados

Características demográficas y bioquímicas de los pacientes diabéticos y controles sanos

Para este estudio, se reclutaron 13 pacientes con crisis hiperglicémica que cumplieron con criterios de inclusión y exclusión definidos *a priori* (Tabla I). A todos ellos, se tomó muestras de sangre periférica tanto al momento de ingreso al hospital como una vez resuelto el cuadro agudo dentro de la misma hospitalización. En 9 de los 13 casos se pudo obtener una tercera muestra en un control ambulatorio realizado entre 3

a 6 meses post-alta hospitalaria. Adicionalmente, este estudio consideró un grupo de 7 individuos no diabéticos, no dislipidémicos y normopeso, como controles sanos.

Desde un punto de vista demográfico, los pacientes presentaron un promedio de edad 40 ± 19 años con predominio del género femenino (76%). Desde un punto de vista clínico (Tabla II), 62% de los pacientes correspondieron a DM tipo 1, 23% a DM tipo 2 y un 15% a diabetes autoinmune latente del adulto (LADA). El tipo de descompensación metabólica aguda de estos pacientes fue mayoritariamente cetoacidosis diabética (92%), siendo una mala adherencia al tratamiento (54%) la principal causa de descompensación seguida por debut de diabetes e infecciones. Nutricionalmente, el grupo de pacientes diabéticos presentaba sobrepeso con un índice de masa corporal promedio de 26 (rango 22-31) kg/m^2 . Seis (46%) de los 13 pacientes presentaban alguna patología asociada, incluyendo hipertensión arterial, hipotiroidismo, dislipidemia, asma, enfermedad celíaca, trastornos de la conducta alimentaria, trastornos del ánimo y enfermedad renal crónica etapa II. Dentro de estos pacientes, solamente 3 de ellos eran fumadores, 2 usaban estatinas y 7 tenían terapia previa con insulina.

Los datos bioquímicos de estos pacientes que presentaron 14 eventos independientes de descompensación diabética fueron comparados entre el ingreso y el momento de resolución del cuadro agudo en la hospitalización. El tiempo (promedio \pm DS) transcurrido desde el ingreso hasta el cumplimiento de los criterios de resolución del evento agudo fue 22 ± 18 h. Todos los parámetros -con excepción de los niveles séricos de creatinina, sodio y potasio- fueron significativamente diferentes entre el ingreso y la recuperación de la descompensación diabética (Tabla III).

Tabla I

Criterios de inclusión y exclusión de pacientes con descompensación diabética aguda

Criterios de Inclusión

- Hombres o mujeres \geq de 17 años de edad.
- Debutantes o portadores de diabetes mellitus, que estén cursando cuadro de descompensación aguda manifestada como cetoacidosis diabética (CAD) o síndrome hiperglicémico hiperosmolar.
- Consentimiento informado por parte de los pacientes o sus familiares.

Exclusión

- Antecedente de cáncer sólido o hematológico dentro de los últimos 5 años.
- Hemoglobinopatías, anemia o transfusión en los últimos 3 meses.
- Hemorragia activa.
- Serología positiva para virus de inmunodeficiencia humana.
- Uso de medicamentos diabetogénicos, inmunosupresores y antipsicóticos.
- Otras endocrinopatías descompensadas.
- Evento coronario reciente o insuficiencia cardíaca descompensada.
- Shock séptico.
- Enfermedad renal crónica etapa IV o V.
- Daño hepático crónico.
- Enfermedades reumatológicas activas.
- Ingesta excesiva de alcohol.

Tabla II
Características demográficas y clínicas de los pacientes diabéticos hospitalizados con descompensación metabólica

Variable	n=13
Edad - años (promedio ± DS)	40 (±19)
Sexo - n (% mujeres)	10 (76)
Tipo de DM	
DM1 - n (%)	8 (62)
DM2 - n (%)	3 (23)
LADA - n (%)	2 (15)
Tipo de Descompensación	
CAD - n (%)	12 (92)
SHH - n (%)	1 (8)
Causa de Descompensación	
Debut - n (%)	3 (23)
Mala adherencia - n (5)	7 (54)
Infecciones - n (5)	3 (23)

DM 1: diabetes mellitus tipo 1.
DM 2: diabetes mellitus tipo 2.
LADA: diabetes autoinmune latente del adulto.
CAD: cetoacidosis diabética.
SHH: síndrome hiperglicémico hiperosmolar.

Tabla III
Datos descriptivos bioquímicos séricos de pacientes diabéticos al momento de ingreso y resolución del cuadro de descompensación diabética aguda

Variable	Ingreso	Resolución	P
pH	7,19 (±0,16)	7,38 (±0,03)	0,003
Glicemia (mg/dl)	499 (±166)	179 (±59)	0,0001
Osmolaridad (mOsm/L)	296 (±8)	278 (±6)	0,0001
Anion GAP (mmol/L)	26 (±10)	15 (±4)	0,004
Creatinina (mg/dl)	0,98 (±0,6)	0,6 (±0,08)	NS
BUN (mg/dl)	19 (±13)	10 (±4)	0,022
Na (mEq/L)	133 (±6)	134 (±2)	NS
K (mEq/L)	4 (±0,8)	4 (±0,4)	NS
Cl (mEq/L)	93 (±11)	101 (±3)	0,041
Bicarbonato (mEq/L)	12 (±4)	20 (±4)	0,0032
HbA1c	12,5 (±3)		
Colesterol Total (mg/dl)	207 (±37)		
LDL (mg/dl)	110 (±38)		
HDL (mg/dl)	50 (±27)		
Triglicéridos (mg/dl)	459 (±474)		

Valores expresados como promedio ± SD.
NS = valor p no significativo.

Perfil de colesterol lipoproteico en pacientes diabéticos descompensados y post-resolución del evento agudo

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de colesterol en las diferentes fracciones lipoproteicas entre el momento del ingreso y de la resolución intrahospitalaria del cuadro agudo (Fig. 1). Si bien los datos obtenidos durante el control ambulatorio post-hospitalización muestran un menor nivel de colesterol VLDL y un incremento en los niveles de colesterol LDL y HDL con respecto a los valores determinados dentro del hospital, la diferencia entre estos valores tampoco fue estadísticamente significativa.

Funcionalidad antioxidante de HDL en pacientes con diabetes descompensada

En la figura 2, se grafican los datos obtenidos en el ensayo de actividad antioxidante de HDL en los pacientes y en los controles sanos. El valor de fluorescencia en unidades arbitrarias (UAF) indica el grado de oxidación del compuesto fluorescente en presencia de HDL relativo a la fluorescencia del reactivo en ausencia de HDL. Por lo tanto, a menor valor de fluorescencia, mayor la capacidad antioxidante de las HDL.

En un primer análisis de ANOVA global mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey entre las HDL de las cuatro condiciones: pacientes al ingreso, a la resolución, durante el control ambulatorio y sujetos sanos, observamos que las partículas de HDL de los pacientes diabéticos descompensados al ingreso al hospital presentaron una actividad antioxidante significativamente menor a los sujetos sanos, evidenciada por una mayor fluorescencia detectada en el ensayo ($p < 0,05$). Luego de la resolución del evento dentro del hospital, las HDL mejoraron su actividad antioxidante resultando en una menor fluorescencia producida por

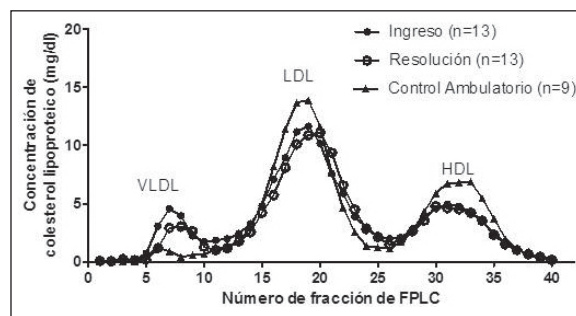


Fig. 1.—Perfil de colesterol lipoproteico en pacientes diabéticos al ingreso por descompensación metabólica aguda, al momento de resolución del cuadro dentro de la hospitalización y en control ambulatorio post-alta. Las curvas representan los promedios de niveles de colesterol en las fracciones de las diferentes clases de lipoproteínas obtenidos de los pacientes en cada momento del estudio: ingreso (n=13), resolución (n=13) y control ambulatorio (n= 9).

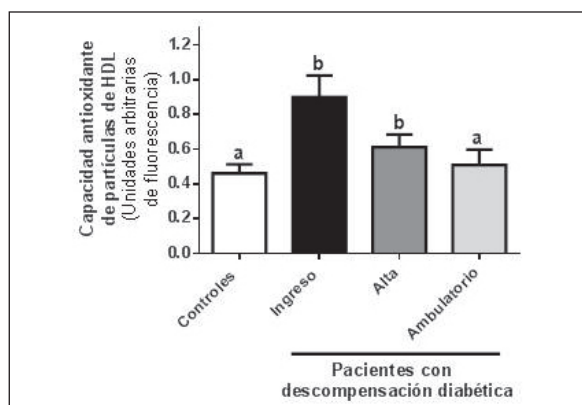


Fig. 2.—Funcionalidad antioxidante de las partículas de HDL en sujetos controles, y en pacientes diabéticos con descompensación aguda y en fase de recuperación posterior. Un valor de fluorescencia relativa < 1 indica la presencia de partículas de HDL anti-oxidantes. Las barras indican el promedio \pm error estándar de la fluorescencia observada luego de la incubación del reactivo oxidado con partículas de HDL de los sujetos sanos controles ($n=7$) o de los pacientes con descompensación diabética evaluados en diferentes momentos del estudio: ingreso ($n=14$), resolución ($n=14$) y control ambulatorio ($n=10$). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos correspondientes (ANOVA, $p < 0,05$).

DCF presente en el ensayo, aunque esta reducción no alcanzó significancia estadística comparada con la fluorescencia al ingreso ($p=0,12$). Las HDL obtenidas de los pacientes durante el control ambulatorio presentaron una funcionalidad similar a las de los sujetos sanos y significativamente mayor a la del cuadro de descompensación aguda, ya que los niveles de fluorescencia en el ensayo fueron similares a los obtenidos con las HDL de los controles y estadísticamente menores a los observados cuando se evaluaron las partículas de HDL al ingreso ($p<0,05$).

Con el fin de determinar si existía una mejoría gradual en la actividad antioxidante de los pacientes posterior a la resolución del cuadro agudo, se realizó un análisis de correlación por rangos de Spearman para la fluorescencia obtenida en las muestras de HDL de los pacientes al ingreso, durante la resolución y en el control ambulatorio. Los datos indicaron una correlación significativa negativa para los valores de autofluorescencia del compuesto oxidado ($R_s = -0,44$; $p=0,005$), y por lo tanto, una mejora gradual en la capacidad antioxidante posterior a la resolución del cuadro agudo.

Relación entre la actividad antioxidante y los parámetros demográficos y clínico-bioquímicos de los pacientes

No se detectó ninguna asociación significativa entre los datos demográficos y clínico-bioquímicos con la funcionalidad de las HDL aisladas tanto al ingreso como en la resolución del evento diabético agudo, a excepción de una correlación inversa ($r^2=0,31$) entre

los valores de glicemia medidos al momento de ingreso y la capacidad antioxidante de las partículas de HDL recolectadas cuando se resolvió la descompensación diabética ($p= 0,046$) (Fig. 3).

Determinación de la actividad paraoxonasa-1 al ingreso por descompensación diabética y en el control ambulatorio

Teniendo en cuenta que una de las principales proteínas con actividad antioxidante asociada a las HDL es la paraoxonasa-1, comparamos la actividad de esta enzima en plasma de los pacientes durante la descompensación diabética y luego de la normalización de la actividad antioxidante de las HDL, durante el control ambulatorio. De acuerdo con lo esperado, la actividad de paraoxonasa presentó un aumento significativo en las HDL de los pacientes en el control ambulatorio comparado con el ingreso ($p<0,02$) (Fig. 4).

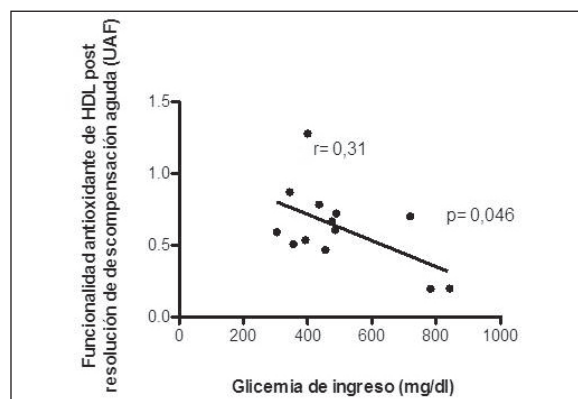


Fig. 3.—Correlación entre niveles de glicemia de ingreso y la funcionalidad antioxidante de las HDL al momento de resolución de la descompensación diabética aguda. La fluorescencia obtenida en el ensayo in vitro para las partículas de HDL aisladas de cada paciente cuando se resolvió la descompensación aguda se correlacionó con los niveles de glicemia detectados al momento del ingreso hospitalario.

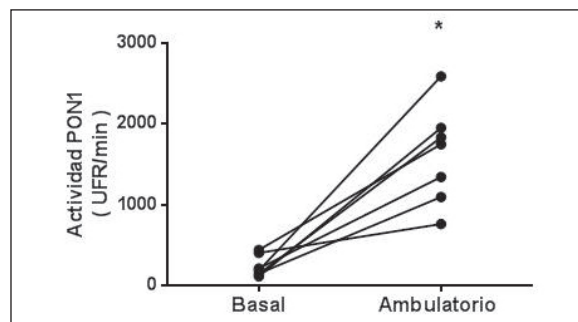


Fig. 4.—Actividad de paraoxonasa-1 sanguínea en pacientes diabéticos con descompensación aguda y en el control ambulatorio. Se observó un aumento significativo entre la actividad PON1 medida en el ingreso versus el control ambulatorio ($p<0,02$ por test pareado de Wilcoxon).

Discusión

Según nuestro conocimiento, este estudio constituye el primer análisis y reporte sobre la medición de la funcionalidad de las partículas de HDL durante un cuadro de crisis hiperglicémica y sus cambios en asociación a la resolución de este evento agudo. Los resultados indican que las lipoproteínas HDL muestran una clara disfuncionalidad antioxidante en los pacientes diabéticos descompensados en comparación a un grupo control sano y que el deterioro de esta capacidad antioxidante es revertido desde el ingreso hospitalario hasta el momento de la resolución del evento agudo y el control ambulatorio, alcanzando valores de funcionalidad similar a personas sanas.

En nuestro estudio no observamos una diferencia significativa entre la funcionalidad de las lipoproteínas HDL en pacientes diabéticos recuperados del cuadro agudo o durante el control ambulatorio en comparación con el grupo control sano. A diferencia de nuestro estudio, Morgantini y cols.⁹ mostraron una diferencia de 21-26% entre la capacidad antioxidante en las partículas de HDL de diabéticos crónicos estables y sujetos controles; sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta diferencia mostró significancia con un tamaño muestral mucho mayor al de nuestro estudio.

La recuperación significativa de la funcionalidad de las HDL al momento de la resolución del cuadro agudo en un período inferior a las 24 horas hace plantear que la mejoría se debe a cambios cualitativos en las mismas partículas de HDL que se mostraban disfuncionales al ingreso y no se explican por recambio del *pool* de HDL dado que estas lipoproteínas tienen una vida media larga de varios días y hasta una semana en la circulación sanguínea.

Nuestros hallazgos que demuestran disfuncionalidad antioxidante de las partículas de HDL de pacientes con descompensación diabética son consistentes con estudios previos en partículas de HDL obtenidas de pacientes con procesos inflamatorios agudos, que han establecido un desplazamiento de la apoA-I y disminución de la actividad de ciertas enzimas (PON-1, acetil-hidrolasa del factor activador de plaquetas y glutatión peroxidasa) de estas lipoproteínas por parte de las proteínas de fase aguda e interleuquinas^{4,7,8,13}. Una disminución aguda y transitoria en los niveles y/o actividad de la PON-1 ha sido descrita dentro los 3 primeros días de un cuadro séptico agudo en humanos con recuperación paulatina de su actividad¹⁴ y también en experimentos con conejos en los cuales se infundió aceite de crotón con la consecuente detección de menor actividad de PON1 y AH-PAF durante las primeras 72 horas y su posterior recuperación⁶.

En forma consistente con la recuperación de la función antioxidante de las HDL en los pacientes diabéticos descompensados, la actividad de una de las principales enzimas asociadas a las HDL con importante

actividad antioxidante, la PON-1, también mostró una mejora posterior a la resolución del cuadro de descompensación. Teniendo en cuenta evidencia previa -indicando que tanto la actividad antioxidante de las HDL como la actividad de la PON se reduce en pacientes diabéticos o resistentes a insulina^{15,16}, nuestros resultados sugieren que la actividad de PON-1 podría ser un importante determinante de los cambios observados en la actividad antioxidante total de las HDL durante la descompensación diabética en estos pacientes. Si bien el mecanismo por el cual la actividad de PON-1 se reduce en la diabetes es aún desconocido, éste se ha asociado a los niveles de hiperglicemia. La glicación de proteínas puede no sólo inactivar a la PON-1 en sí misma, sino también aumentar la peroxidación de lípidos en las HDL^{17,18}. Los datos clínicos respaldan este mecanismo, ya que tanto los sujetos con glicemia de ayuno elevada como los pacientes con síndrome metabólico presentan menor actividad de PON-1^{19,20}.

Previamente, se ha reportado que existe asociación entre el contenido proteico y la actividad de enzimas presentes en las HDL y los niveles de HbA1c detectados en los pacientes diabéticos¹³. Referente a las correlaciones de los datos demográficos y clínico-bioquímicos y la funcionalidad de las partículas de HDL en este estudio, no hubo valores que demostraran una asociación significativa entre estas variables, a excepción de una débil correlación inversa -a primera vista paradójica- entre los valores de glicemia de ingreso y la funcionalidad antioxidante de las HDL medida en el momento de la recuperación del cuadro agudo. Una posible explicación para esta asociación inesperada sería que aquellos pacientes con mayor hiperglicemia al ingreso al hospital reciben un manejo más agresivo lo que determina una mayor recuperación de la funcionalidad de las HDL cuando se logra la corrección de la descompensación aguda.

En resumen, la funcionalidad antioxidante de las lipoproteínas HDL de los pacientes diabéticos descompensados está significativamente disminuida durante una crisis hiperglicémica aguda de forma reversible, alcanzando niveles similares a los de personas sanas luego de la recuperación del evento. Se requieren estudios adicionales para establecer el valor pronóstico de esta alteración funcional de las HDL en el cuadro de descompensación aguda así como para definir los determinantes que originan este trastorno funcional en esta clase de lipoproteínas y si su corrección se traduce en mejor evolución del evento agudo.

Agradecimientos

Este estudio se desarrolló con el financiamiento del Proyecto #1110712 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico de Chile. Agradecemos al Dr. Pablo Olmos por su asesoría en el análisis estadístico de los datos.

Referencias

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37 Suppl 1:S81-90.
2. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K & Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998; 339(4): 229-34.
3. Van Linthout S, Spillmann F, Schultheiss HP & Tschope C. High-density lipoprotein at the interface of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disorders. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(13): 1504-16.
4. Kontush A & Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 2006; 58(3): 342-74.
5. Lubrano V, Baldi S, Ferrannini E, L'Abbate A & Natali A. Role of thromboxane A2 receptor on the effects of oxidized LDL on microvascular endothelium nitric oxide, endothelin-1, and IL-6 production. *Microcirculation*. 2008; 15(6): 543-53.
6. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM & Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest*. 1995; 96(6): 2758-67.
7. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ & Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol*. 2011; 8(4): 222-32.
8. Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, Fogelman AM & Lusis AJ. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2001; 11(3-4): 155-61.
9. Morgantini C, Natali A, Boldrini B, Imaizumi S, Navab M, Fogelman AM, Ferrannini E & Reddy ST. Anti-inflammatory and antioxidant properties of HDLs are impaired in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60(10): 2617-23.
10. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W & Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974; 20(4): 470-5.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-75.
12. Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM: A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res* 2001, 42(8):1308-1317.
13. Murphy AJ & Woollard KJ. High-density lipoprotein: a potent inhibitor of inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; 37(7): 710-8.
14. Novak F, Vavrova L, Kodydkova J, Novak F Sr, Hynkova M, Zak A, Novakova O. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin Exp Med*. 2010; 10(1):21-5.
15. Murakami H, Tanabe J, Tamasawa N, Matsumura K, Yamashita M, Matsuki K, Murakami H, Matsui J & Suda T. Reduction of paraoxonase-1 activity may contribute the qualitative impairment of HDL particles in patients with type 2 diabetes. *Diab Res Clin Pract*. 2013; 99(1): 30-8.
16. Yamada A, Shoji T, Tahara H, Emoto M & Nishizawa Y. Effect of insulin resistance on serum paraoxonase activity in a non-diabetic population. *Metabolism*. 2001; 50(7): 805-11.
17. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H & Peters AL. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia*. 2000; 43(3): 312-20.
18. Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L & Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol*. 2001; 38(4): 163-9.
19. Leviev I, Kalix B, Brulhart Meynet MC & James RW. The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia*. 2001; 44(9): 1177-83.
20. Senti M, Tomas M, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masia R & Marrugat J. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(11): 5422-6.