

73



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN
Departamento de
Laboratorio Profesional

EFFECTO DE LA NICOTINAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN DIABETES EXPERIMENTAL

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

REYNA ELIZABETH TEJEDA HERNANDEZ

DIRECTORAS:
M. EN C. MARGARITA DIAZ FLORES
Q.F.B. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO. 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ZONAL NACIONAL
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN Q. Ma del Carmen Garcia Mjares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS

Efecto de la Nicotinamida sobre la Actividad de la Glucosa-6-Fosfato
Deshidrogenasa en Diabetes Experimental.

que presenta la pasante Reyna Elizabeth Isolda Hernández
con número de cuenta 4304476 para obtener el título de
Ingeniera Farmacéutica Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Mex. a 2 de Julio de 2022

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Francisco López Mejía</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Martha P. Zúñiga Cruz</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rene Damián Santos</u>	

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, bajo la dirección de la M. en C. Margarita Díaz Flores.

DEDICATORIAS

A Dios

A mis padres Reyna y Manuel

A mis hermanos Salvador y Susana

Gracias por el amor y apoyo que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Kumate, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, por su apoyo para la realización de este trabajo.

De manera especial a la M. en C. Margarita Díaz Flores por facilitarme la realización de este trabajo y sobretodo por brindarme su invaluable amistad.

A la Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez por apoyarme en la realización de este trabajo.

A todos los compañeros de la Unidad de Investigación: Margarita, Miguel, Genoveva, Dalila, Alfonso, Clarita, Rafael, Cecilia, Martín, Olga, Rebeca, Nora, Gaby, Yadira, Irma, Juan, Adán, Arturo y a Nestor; por su apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, en particular a mi *Alma mater* la FES Cuautitlán, a la que le agradezco la oportunidad de superarme personal y académicamente y de la que guardaré recuerdos gratos y únicos.

A Carlos por estar a mi lado en momentos difíciles.

A mis compañeros y amigos de la FESC, en especial a Edith por escucharme y apoyarme siempre que lo he necesitado.

A mis amigos Jesús y Moisés porque que a pesar de los años seguimos siendo amigos.

A todas las personas que han contribuido para hoy sea lo que soy.

INDICE

Pág.

Lista de figuras	
Lista de tablas	
Lista de abreviaturas	
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS	3
3.1. Diabetes mellitus tipo 1	4
3.1.1. Diabetes mediada por procesos autoinmunes	4
3.1.2. Diabetes idiopática	5
3.2. Diabetes mellitus tipo 2	6
3.3. Otros tipos específicos de diabetes	6
3.4. Diabetes gestacional	7
4. DIABETES EXPERIMENTAL	8
4.1. Diabetes espontánea	8
4.2. Diabetes inducida	8
4.3. Inducción química	9
4.3.1. Estreptozotocina	10
5. COMPLICACIONES EN LA DIABETES MELLITUS	11
6. ESTRÉS OXIDATIVO	12
6.1. Radicales libres y estrés oxidativo	12
6.2. Estrés oxidativo en diabetes mellitus	16
7. GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA	21
7.1. Oxidación de la glucosa. ruta de las pentosas fosfato	21
7.2. Regulación de la G6PD	22
7.3. Deficiencia de la G6PD	25
7.4. Importancia de la G6PD bajo estrés oxidativo	26

8. <u>NICOTINAMIDA</u>	27
8.1. Importancia de la nicotinamida en DM.....	28
9. <u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	30
10. <u>OBJETIVOS</u>	31
10.1. Objetivo general.....	31
10.2. Objetivos particulares.....	31
11. <u>HIPÓTESIS</u>	31
12. <u>JUSTIFICACIÓN</u>	33
13. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	34
13.1. Animales.....	34
13.2. Tratamientos a los animales.....	34
13.3. Obtención de los tejidos.....	34
13.4. Determinación de Glucosa.....	36
13.5. Cuantificación de Insulina.....	38
13.6. Medición de la actividad enzimática de la G6PD.....	38
13.7. Determinación de Proteínas.....	41
13.8. Análisis estadístico.....	42
14. <u>RESULTADOS</u>	44
14.1. Efecto de la nicotinamida sobre el peso corporal y las concentraciones de glucosa e insulina.....	44
14.2. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de la G6PD.....	44
15. <u>DISCUSIÓN</u>	53
16. <u>CONCLUSIONES</u>	57
17. <u>APÉNDICE</u>	58
17.1. Lista y preparación de reactivos.....	58
18. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura molecular de la estreptozotocina.....	10
Figura 2. Detoxificación de radicales libres de oxígeno.....	16
Figura 3. Esquema de reacción glucosilación no enzimática de proteínas.....	18
Figura 4. Autooxidación de la glucosa y formación de especies reactivas de oxígeno.....	19
Figura 5. Activación de la vía del sorbitol.....	20
Figura 6. Participación de la G6PD en el metabolismo celular.....	23
Figura 7. Vía de las pentosas fosfato.....	24
Figura 8. Estructura molecular de la nicotinamida.....	27
Figura 9. Esquema metodológico general.....	35
Figura 10. Tratamiento a los animales.....	36
Figura 11. Obtención de los tejidos.....	37
Figura 12. Cuantificación de insulina.....	40
Figura 13. Procesamiento del tejido.....	41
Figura 14. Medición de la actividad enzimática de la G6PD.....	42
Figura 15. Determinación de proteínas.....	43
Figura 16. Efecto de la nicotinamida sobre el peso corporal en diabetes experimental.....	46
Figura 17. Efecto de la nicotinamida sobre la concentración de glucosa en diabetes experimental.....	47
Figura 18. Efecto de la nicotinamida sobre la concentración de insulina en diabetes experimental.....	48
Figura 19. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa hepática.....	51
Figura 20. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa pancreática.....	52

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de la diabetes mellitus	5
Tabla 2. Principales características diferenciales entre diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.....	7
Tabla 3. Determinación de proteínas.....	43
Tabla 4. Efecto de la nicotinamida sobre el peso corporal y las concentraciones de glucosa e insulina.....	45
Tabla 5. Efecto de la nicotinamida sobre el peso húmedo de diferentes órganos en diabetes experimental.....	49
Tabla 6. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de la G6PD en diabetes experimental.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

4-hidroxi-2-nonenal	HNE
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido ribonucleico	ARN
Adenosina 3',5' monofosfato cíclico	AMPc
Adenosina 5' trifosfato	ATP
Adenosina difosfato	ADP
Aldosa reductasa	AR
Análisis de varianza	ANOVA
Asociación Americana de Diabetes	ADA
Bióxido de carbono	CO ₂
Bióxido de nitrógeno	NO ₂
Decilitro	dL
Desviación estándar	DS
Diabetes mellitus insulino-dependiente	DMID
Diabetes mellitus no insulino-dependiente	DMNID
Diabetes mellitus	DM
Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido	NADH
Dinucleótido de nicotinamida y adenina	NAD ⁺
Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas	ENEC
Estreptozotocina	STZ
Factor de crecimiento epidermal	EGF
Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina	NADP ⁺
Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido	NADPH
Fuerza de gravedad	g
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	G6PD
Glucosa-6-fosfato	G6P
Glutation oxidado	GSSG

Glutación peroxidasa	GPx
Glutación	GSH
Grados centígrados	°C
Gramos	g
Grupo sulfhidrilo	SH
Hemoglobina glicosilada	HbAc
Horas	h
Intraperitoneal	i.p.
Ión nitronio	NO_2^+
Kilogramo	kg
Kilobases	kb
Litro	L
Metro	m
Microgramos	μg
Microlitros	μL
Miligramos	mg
Mililitros	mL
Milimolar	mM
Miliumidades	mU
Minutos	min
Molar	M
Nanómetros	nm
Nicotinamida	NA
Organización Mundial de la Salud	OMS
Oxido nítrico	NO^{\cdot}
Oxígeno molecular	O_2
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Peroxinitrito	ONOO^{\cdot}
Peso volumen	p/v
Por ciento	%
Potencial de hidrógeno	pH

Probabilidad	P
Producto final de glicosilación avanzada	PFGA
Radiaciones ultravioleta	UVA
Radical hidroxilo	OH [•]
Radical superóxido	O ₂ ^{•-}
Singulete de oxígeno	¹ O ₂
Sorbitol deshidrogenasa	SDH
Superóxido dismutasa	SOD
Temperatura ambiente	T °A
Unidades Internacionales	UI
Unidades	U

I. RESUMEN

La diabetes mellitus constituye una enfermedad metabólica que resulta de la combinación de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas; con repercusión en las lesiones vasculares y neurológicas que finalmente son el sustrato de las complicaciones tardías y eventualmente de la muerte. El principal factor de riesgo en las complicaciones es la hiperglicemia por generar un estrés oxidativo, el que contribuye de manera importante en las anormalidades metabólicas.

Las evidencias clínicas y experimentales han demostrado, que la condición de estrés oxidativo estriba principalmente en cambios en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Debido a que es la fuente principal en generar el NADPH requerido por los sistemas antioxidantes como son: la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, así como el péptido glutatión.

Uno de los precursores de NADPH es la nicotinamida a quien se le atribuyen efectos benéficos en diabetes experimental y en el humano, es probable que los efectos de la nicotinamida en organismos diabéticos se deba a que favorezca un aumento de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y esto contribuya en producir NADPH requerido por los sistemas antioxidantes para proteger del daño celular ocasionado por el estrés oxidativo. Por lo tanto, en este estudio se analizaron los efectos de la nicotinamida sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato en rata diabética. Los grupos en estudio estuvieron integrados de la siguiente manera: A) control, B) nicotinamida, C) diabético, D) diabético más nicotinamida y E) diabético más nicotinamida, suplementadas con tres refuerzos de nicotinamida a intervalos de 72 h.

Las principales características metabólicas de los animales en estudio, 15 días post-tratamiento fueron las siguientes: el grupo C presentó una disminución del peso corporal (41%) con respecto al grupo A. En los grupos D y E fue del 27% y 12% respectivamente. El grupo B mostró una disminución del 12% con respecto al grupo control. La concentración de glucosa sanguínea (mg/dL) más alta correspondió al grupo C (511 ± 44), el grupo D disminuyó parcialmente (197 ± 45), regresando a valores normales el grupo E (162,5 ± 10). El comportamiento de las concentraciones de insulina (U/l) fue a la inversa con respecto a las concentraciones de glucosa. Los valores más altos correspondieron a los

grupos A (27.01 ± 3) y B (29.4 ± 1), seguido del grupo D (26.73 ± 3) y E (24.43 ± 4), y el valor más bajo fue del grupo C (9.8 ± 2)

Con respecto a las actividades de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa hepática, las cuales están dadas en mU/mg de proteína, el valor más bajo fue del grupo C (3.35 ± 1.65) con respecto al control (9.75 ± 1.6). Las actividades entre los grupos D y E fueron similares (7.44 ± 0.7 y 7.46 ± 0.9 respectivamente) con tendencia a una recuperación de la actividad. El grupo B (10.04 ± 1.7) tuvo un comportamiento similar al grupo A (9.75 ± 1.6). En el tejido pancreático la actividad siguió el mismo comportamiento que el hígado con un ligero aumento sin ser significativo.

Con base en los resultados obtenidos se sugiere a la nicotinamida como protector de las alteraciones inducidas por la estreptozotocina como son disminución del peso corporal, la insulinemia, hiperglicemia y disminución de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

2. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la diabetes mellitus plantea un grave problema mundial de salud pública; debido a que su incidencia y prevalencia aumentan constantemente, en particular en los países en vías de desarrollo o de industrialización reciente (1). En México, es una de las enfermedades crónico degenerativas que se ha colocado paulatinamente, desde los años setenta, dentro de las diez primeras causas de muerte (2). A mediados de la década de los 90, el país ocupó el décimo lugar mundial con 4 millones de enfermos. En el lapso comprendido entre 1994 y 1998 se presentó un incremento del 83 % en el número de casos diagnosticados; y en 1998 fue la séptima causa de morbilidad. En el 2001 la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC) dio a conocer que el 8.2 % de la población entre 20 y 60 años padecen la enfermedad y cerca del 30% la desconoce (3). Anualmente la Secretaría de Salud registra más de 180 mil casos nuevos (4).

Con estos antecedentes, la diabetes mellitus se ha considerado como prioridad del sector salud, en la que es necesario reorientar las acciones de prevención y control de la enfermedad; dando mayor énfasis a los factores que anticipen al daño y que comprendan medidas protectoras, de identificación y modificación oportuna de los factores de riesgo.

3. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

En la actualidad, la diabetes mellitus (DM) incluye un grupo de trastornos diferentes en sus características clínicas, genéticas y fisiopatológicas, con un común denominador que es la intolerancia a la glucosa. Con base en lo anterior, es difícil presentar una buena definición del síndrome de diabetes mellitus. Sin embargo, la propuesta por Felig y colaboradores, describe las características importantes: "La diabetes mellitus se considera una enfermedad sistémica multifactorial, determinada genéticamente, que afecta al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, asociada a una deficiencia absoluta o relativa en la secreción de insulina, con grados variables de resistencia a esta".

La clasificación actual de la diabetes fue propuesta en el año de 1997 por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) junto con nuevos criterios para la detección y el

diagnóstico de la enfermedad (5), esta propuesta coincide con la realizada por expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicada en 1998 (6). Esta clasificación comprende cuatro categorías básicas (Tabla 1). La clasificación anterior de la DM se basaba, principalmente, en el grado en que el paciente era dependiente de la insulina, y a pesar de que realizaba una distinción lógica entre las dos formas principales de presentación de la DM, establecía subcategorías, hasta cierto punto confusas. En la nueva clasificación propuesta por la OMS y la ADA, los cambios fundamentales radican en:

- La omisión de los términos clásicos Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente (DMID) y Diabetes Mellitus no Insulino-Dependiente (DMNID). En su lugar, se deben utilizar únicamente los términos "tipo 1" y "tipo 2", ya que la mayoría de los que padecen DM tipo 2 tratados con insulina no son dependientes de ella, aunque la necesiten para obtener un buen control metabólico.
- La desaparición de las clases de riesgo estadístico: anomalía previa y potencial tolerancia a la glucosa.
- Se propone un nuevo grupo denominado "otros tipos específicos de diabetes", que engloba a las anteriormente denominadas diabetes secundarias y a las debidas a defectos genéticos, consideradas anteriormente dentro de las tipo 2.

3.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

3.1.1. Diabetes mediada por procesos autoinmunes

Esta es causada por una destrucción (por mecanismos de autoinmunidad) de la célula β pancreática. Incluye a pacientes con importante insulinopenia y tendencia a desarrollar cetoacidosis, a menos que se les trate con insulina. Aunque puede ocurrir a cualquier edad, la mayor incidencia es entre los 10 y los 12 años, pero prácticamente en la mayoría, el diagnóstico se establece antes de los 20 años. Representa cerca del 10 % de los casos de DM y parece tener mayor prevalencia en la raza blanca. El comienzo de esta enfermedad puede ser brusco y los individuos afectados pueden convertirse en dependientes de insulina, precisando del tratamiento para sobrevivir. De forma habitual presentan un peso normal, o ligeramente por debajo de lo normal, la presencia de obesidad no es incompatible con el diagnóstico de esta forma de DM.

En este proceso de autoinmunidad, se encuentran anticuerpos tanto anti-isletos como anti-insulina, junto con un proceso inflamatorio alrededor de las células β pancreáticas y una activación de los linfocitos T. La destrucción de las células productoras de insulina se completa entre 5 y 10 años posteriores a la aparición de los primeros síntomas, en esta etapa, la deficiencia de insulina es absoluta y coincide con la ausencia de anticuerpos anticélulas β en la circulación (6).

Tabla 1 (6)

Clasificación de la diabetes mellitus

- I. Diabetes mellitus tipo 1
 - A. Mediada por inmunidad
 - B. Idiopática
- II. Diabetes mellitus tipo 2
- III. Otros tipos específicos
 - A. Defectos genéticos de la función de la célula β
 - B. Defectos genéticos de la acción de la insulina
 - C. Enfermedades del páncreas exocrino
 - D. Endocrinopatías
 - E. Inducida por químicos o fármacos
 - F. Asociada a infecciones
 - G. Formas poco comunes de diabetes inmune
 - H. Otros síndromes genéticos relacionados con diabetes
- IV. Diabetes mellitus gestacional

3.1.2. Diabetes idiopática

Constituye una forma poco frecuente de la DM tipo I de etiología desconocida, que se presenta mayoritariamente en sujetos de origen asiático o africano (6). Presenta un componente hereditario y entre los afectados, no se presentan las alteraciones autoinmunes propias de la célula β (7).

en alteraciones del páncreas exocrino (7).

Este subtipo de DM abarca una amplia variedad de tipos específicos de diabetes, incluyendo defectos genéticos en la función de las células β o en la acción de la insulina, y

3.3. OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES

tipo 1 y tipo 2

En la Tabla 2 se presentan las principales características diferenciales entre la DM

Tabla de actividad física (8)

abdominal. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes aumenta con la edad, el peso y la
 métodos tradicionales, presentan un aumento del porcentaje de grasa en la región
 algunos de estos sujetos, aunque no pueden considerarse obesos de acuerdo con los
 frecuentemente asociado a la DM tipo 2, presentándose hasta en el 80% de los pacientes;
 del peso ideal o un índice de masa corporal superior a 27 kg/m²) es un factor
 en el desarrollo de la DM tipo 2 en los sujetos susceptibles. Así, la obesidad (más del 20%
 Con relación a otros factores que no son genéticos, estos juegan un importante papel

además

además se ha demostrado una concordancia de diabetes cerca del 100% en gemelos
 diabetes aparece en niños, adolescentes y adultos con una herencia dominante autosómica;
 El componente genético es determinante de modo que en algunas familias, la

una intolerancia a la glucosa por agotamiento pancreático (9).

periférica a la insulina y un hipersensibilismo, condiciones que tarde o temprano llevan a
 La DM tipo 2 se encuentran dos condiciones sobresalientes: un estado de resistencia
 centros urbanos y/o modifican su alimentación tradicional. Dentro de la fisiopatología de
 años. Existe cierta vulnerabilidad para ciertos grupos étnicos, sobre todo cuando migran a
 puede presentarse en cualquier etapa de la vida, generalmente comienza después de los 40
 cruenta. Es la forma más frecuente de la DM, representa el 90-95% de los casos. Aunque
 sufra algún problema especial, como las infecciones, el embarazo o se tenga que realizar
 como por arbia o por debajo de ellos. En general no se requiere de insulina a menos que
 concentraciones de insulina se pueden encontrar tanto dentro de los márgenes normales
 A diferencia de la anterior, el problema no radica en una insuficiencia, ya que las

3.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2

3.4. DIABETES GESTACIONAL

Son aquellas formas de diabetes que se diagnostican por primera vez en el embarazo. Se presentan en el 2-6 % de las mujeres embarazadas si bien, tras transcurrir el parto, pueden volver a la normalidad. Las mujeres con diabetes gestacional presentan a corto, medio o largo plazo un mayor riesgo de padecer diabetes mellitus (7).

Tabla 2 (6,7)

Principales características diferenciales entre DM tipo 1 y tipo 2		
	DM TIPO 1	DM TIPO 2
Sexo	Igual proporción de hombres y mujeres afectados	Mayor proporción de mujeres afectadas
Edad en la que se realiza el diagnóstico	Menores de 30 años	Mayores de 40 años
Forma de presentación	Brusca	Solapada
Peso	No hay manifestaciones de obesidad	Obesidad frecuente (80%)
Tratamiento con insulina	Casi siempre indispensable	Inicialmente no se precisa pero puede ser necesario para el control metabólico
Carácter hereditario	Afectación en gemelos idénticos (40-50%)	Afectación en gemelos idénticos (90%)
Existencia de autoanticuerpos	85-90%	NO
Presencia de insulinitis insular	50-75%	NO
Niveles de insulinemia	Por debajo de lo normal	Variables, aunque existe un déficit relativo de insulina

4. DIABETES EXPERIMENTAL

Con frecuencia el investigador requiere utilizar modelos experimentales que permitan entender la fisiopatología de la diabetes. Algunos autores consideran que si se conoce la variación en la susceptibilidad de las especies animales hacia los agentes inductores de diabetes se podrá hacer una mejor selección del modelo, a la vez que se puede evitar la pérdida innecesaria de animales y la optimización de recursos en estudios futuros (9).

Por razones éticas, en seres humanos no se permite la inducción de diabetes mellitus. El uso de animales representa enormes ventajas para el estudio de la diabetes, ya que se puede disponer de varias generaciones para estudiarlas con cuidado y en tiempo corto. La diabetes permanente en los animales ofrece un modelo excelente para el estudio de medidas que permitan prevenir la enfermedad. El uso de animales también da oportunidad de estudiar la interacción de factores hereditarios y ambientales como dieta, fármacos, tóxicos y agentes infecciosos (9).

4.1. DIABETES ESPONTÁNEA

Entre los animales, la diabetes espontánea es relativamente común. El primer caso se describió en 1851 en un mono. Esta enfermedad se presenta en una gran variedad de especies animales entre las que se encuentran los perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras y otros animales domésticos y silvestres. En la mayoría de los roedores, la diabetes es de origen genético y se acompaña de marcada obesidad, a excepción de la enfermedad que se presenta en el hamster chino, en el que se observa esta alteración. Los datos de mamíferos superiores son escasos, solo ciertos perros, gatos y unos cuantos primates se han estudiado con detalle. Los pequeños roedores de laboratorio proporcionan una gran cantidad de información, por su cantidad y bajo costo (9).

4.2. DIABETES INDUCIDA

La inducción de la diabetes se logra por diversas técnicas experimentales. La pancreatectomía condujo a la diabetes y fue una observación clave en el estudio de esta

enfermedad. En la actualidad los avances científicos y tecnológicos permiten la realización de estudios inclusive a nivel molecular.

Las hormonas adrenalina, glucagon, glucocorticoides y somatotropina tienen un efecto antagonista sobre la insulina, cuando están presentes en exceso, como respuesta al estrés o consecuencias patológicas de un tumor u otras alteraciones metabólicas, la tolerancia a la glucosa se reduce y puede presentarse hiperglucemia. La adrenalina y el glucagon ejercen el mismo efecto anti-insulínico en animales y en humanos cuando se administran en exceso. De igual manera, la administración de hidrocortisona y de hormona adrenocorticotrópica inducen hiperglucemia e hiperplasia en las células β .

En los animales y en el humano, las lesiones hipotalámicas pueden causar obesidad, los mejores modelos animales estudiados para este síndrome son la rata y el ratón, con lesiones en el núcleo ventromedial del hipotálamo. Estas lesiones pueden ser electrolíticas o químicas. Las ratas sometidas a estos procedimientos presentan obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia, y resistencia a la insulina (9).

4.3. INDUCCIÓN QUÍMICA

El empleo de agentes químicos inductores de diabetes han permitido esclarecer eventos bioquímicos, hormonales y morfológicos que ocurren en un estado diabético.

Existen varias clases de agentes químicos, los primeros son sustancias tóxicas que destruyen a las células β y causan un estado de deficiencia primaria de insulina. El segundo grupo son sustancias que actúan sobre células β pero no las destruyen. Un tercer grupo incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan el páncreas y como consecuencia se produce la diabetes. Este último grupo incluye las hormonas contra insulina, los anticuerpos anti-insulina y algunos agentes quelantes, en particular del zinc.

Los agentes de uso más amplio son la aloxana y la estreptozotocina. Estos compuestos en dosis diabéticas actúan específicamente sobre las células β , solo en el hamster chino se ha sugerido que la estreptozotocina puede dañar a la célula α además de la β (9).

La cantidad de agente inductor que en un 80 % de animales de una especie dada produce hiperglucemia sostenida y necrosis de las células β del islote pancreático y que no causa daño en otros órganos, se le conoce como dosis diabética (9).

4.3.1. Estreptozotocina

La estreptozotocina (1-metil-1-nitrosourea-2-desoxiglucosa) es un antibiótico derivado de *Streptomyces acromogenes* (10). Este compuesto (Fig. 1) provoca diabetes en animales de experimentación a través de la destrucción de la célula β pancreática y se ha demostrado clínicamente que cuenta con propiedades antitumorales en carcinoma de los islotes pancreáticos (10, 11). La STZ es una sustancia diabotogénica ya que es relativamente selectiva para las células β , estas poseen el transportador GLUT 2 que reconoce a la glucosa presente en la molécula y así facilita su entrada a la célula (12).

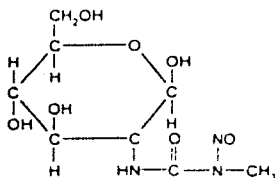


Figura 1. Estructura molecular de la estreptozotocina (11).

La citotoxicidad de la molécula de STZ se atribuye al residuo 1-metil-1-nitrosourea, mediante dos posibles mecanismos diferentes. El primero se debe a que la STZ es un potente agente alquilante que daña al ADN de las células, el átomo de nitrógeno 7 de la guanina es particularmente susceptible a la formación de enlaces covalentes con este agente. Sin embargo, hay que advertir que pueden ser alquilados en menor grado otros átomos en las bases de purina y pirimidina del ADN, como serían los nitrógenos 1 y 3 de adenina, el nitrógeno 3 de citosina y el oxígeno 6 de guanina, así como los átomos de fósforo en las cadenas de ADN y las proteínas en relación con el ADN.

El segundo posible mecanismo se propone basándose en el hecho de que la 1-metil-1-nitrosourea puede descomponerse, generar óxido nítrico y ser este último el responsable directo de la citotoxicidad de la STZ (13).

5. COMPLICACIONES EN LA DIABETES MELLITUS

A pesar de que el pronóstico para el paciente con diabetes ha mejorado notablemente, las complicaciones crónicas de la enfermedad siguen reduciendo la esperanza de vida y afectando la calidad de esta.

Las manifestaciones de la DM son variadas y en muchas ocasiones inespecíficas. La mayoría de signos y síntomas están relacionados con la hiperglicemia sostenida. Los primeros signos y síntomas de la diabetes tipo 2 tienden a aparecer durante la edad adulta, después de la tercera década de la vida y son mucho más discretos que los de la tipo 1. De hecho, un alto porcentaje de pacientes son asintomáticos y tan solo exhiben altas concentraciones de glucosa en el plasma.

No es frecuente que la primera manifestación sea un cuadro agudo de descompensación (cetoacidosis o coma hiperosmolar). Sin embargo, ocasionalmente el paciente diabético es identificado cuando manifiesta alguna complicación crónica de la enfermedad, como la neuropatía diabética.

Las complicaciones de la diabetes se dividen en agudas y crónicas. Las primeras han dejado de ser causa de muerte del diabético. El enfermo con DM tipo 2 vive una vida más larga pero debe enfrentarse a las complicaciones crónicas de la enfermedad. Estas complicaciones se clasifican en microvasculares y macrovasculares.

Las complicaciones microvasculares se relacionan principalmente con daño endotelial, en la microcirculación y se manifiesta como neuropatía, retinopatía y neuropatía diabética (14, 15). Este tipo de complicaciones emerge por influencias genéticas, sobre las cuales se juxtaponen trastornos metabólicos y hemodinámicos y tiene como sello anatómico distintivo el engrosamiento de las membranas basales de los capilares, lo que posteriormente induce una angiopatía oclusiva, hipoxia y daño tisular (16). La evolución de estas complicaciones se correlacionan en la mayoría de los casos con la severidad y duración de la hiperglicemia crónica. Se sabe, por ejemplo, que niveles posprandiales de glucosa superiores a 2 g/l se asocian más frecuentemente con las complicaciones renales, de retina y neurológicas que pueden iniciar cinco o diez años después de manifestarse la enfermedad.

Las complicaciones macrovasculares son las más comunes en la DM tipo 2 e incluyen un grupo de trastornos que se caracterizan por aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón en todas sus modalidades. A diferencia de las complicaciones microvasculares, la asociación de aterosclerosis con hiperglicemia no es tan consistente. Sin embargo, la hiperglicemia posprandial y la concentración de insulina en el suero sí predicen el riesgo de enfermedad aterosclerótica. Estas complicaciones se han asociado con el fenómeno de la resistencia a la insulina, pues se ha demostrado que los factores de riesgo para la enfermedad aterosclerótica (obesidad, hipertensión y dislipidemia) anteceden al diagnóstico de DM hasta por 8 años. El enfermo diabético tiene una frecuencia 2 a 4 veces mayor de infarto al miocardio y otros trastornos asociados con la aterosclerosis en comparación con los no diabéticos.

La evolución de las complicaciones crónicas se correlaciona, en la mayoría de los casos, con la severidad y duración de la hiperglicemia (17). A esta condición se le atribuye ser el principal factor en generar un estrés oxidativo, el que promueve el aumento de las especies oxidantes y la disminución de los sistemas de defensa antioxidantes (18, 19).

6. ESTRÉS OXIDATIVO

6.1. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

El término radical libre se aplica a especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados, ya sea por pérdida o ganancia de ellos. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente "no radical". Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy variable (20).

La mayoría de los radicales libres de interés biológico son los derivados del oxígeno, entre otros pueden mencionarse el singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$), el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), además el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no es un radical libre en sí, pero está estrechamente relacionado por ser el principal precursor del radical hidroxilo (20).

Los radicales libres derivados del oxígeno se producen normalmente en el cuerpo humano: se calcula que del oxígeno respirado del 1 a 3 % es usado para formar radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), parte de estos radicales se producen durante las reacciones de varias moléculas directamente con el oxígeno, por ejemplo: la adrenalina, la dopamina, los citocromos, etc. Además el superóxido también es producido por las células del sistema inmune: los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) como parte del mecanismo empleado para destruir organismos extraños. Este mecanismo es esencial durante la erradicación de las infecciones, aunque en ocasiones una activación excesiva de los fagocitos puede producir daño tisular.

El radical hidroxilo (OH^{\cdot}) también se produce por las radiaciones provenientes del medio. Las radiaciones electromagnéticas con baja longitud de onda pueden romper el agua y generar radicales hidroxilo; este radical es muy reactivo, prácticamente interactúa con la estructura molecular más cercana (20).

Otro radical libre que produce el organismo es el óxido nítrico (NO), que es un segundo mensajero intracelular y participa en la regulación de la presión sanguínea, pero cuando se produce en exceso puede ocasionar daño tisular.

Los radicales libres generados por el metabolismo normal existen en concentraciones muy bajas, de 1×10^{-4} a 1×10^{-9} M, no viajan muy lejos de los sitios en donde se forman, debido a que su vida media es de unos cuantos microsegundos. Cuando un radical libre reacciona con un no radical, pueden formarse otros radicales libres como sucede en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, en donde un radical iniciador remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena de carbonos, este hecho deja un electrón desapareado en el átomo de carbono y se forma un radical de ácido graso, éste, después de varios rearrreglos internos, reacciona con oxígeno molecular y produce un radical peróxido lipídico que a su vez sustrae un segundo hidrógeno de otras moléculas de ácido graso; así se establece una reacción en cadena autocatalítica, de manera que aunque el radical libre iniciador produce solo efectos locales y limitados, el radical secundario y los productos de la degradación oxidativa, ocasionan la formación de radicales libres con efectos amplificados a distancia del sitio donde se formó el primer radical libre (20).

Los radicales libres pueden reaccionar con todos los polímeros estructurales de las células: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

El ataque de los radicales OH^\cdot sobre las membranas celulares fosfolipídicas genera una reacción en cadena, debida posiblemente, a la existencia de dobles enlaces carbono-carbono a nivel de los ácidos grasos insaturados, dobles enlaces que facilitan la deslocalización del electrón libre y por otra parte, la presencia de oxígeno molecular O_2 que fácilmente se aparea por uno de sus electrones con el electrón libre desalojado, el cual potencializará el daño primario (21). El ataque de radicales sobre los ácidos grasos insaturados y la lipoperoxidación en cadena son en última instancia el origen de una desorganización de la arquitectura de la membrana celular, que pierde así su flexibilidad y solidez con el daño consecuente en sus funciones de barrera e información (brechas iónicas, trastornos de la permeabilidad, relación receptor-ligando). Los radicales libres son particularmente dañinos para las proteínas que contengan un grupo sulfhidrilo (SH) (22). Este es el caso de numerosas enzimas celulares y proteínas de transporte, que pueden por esta vía, ser oxidadas e inactivadas. De este ataque de los radicales libres sobre las proteínas, resultan graves alteraciones del metabolismo celular. Las proteínas que constituyen el tejido conjuntivo (microfibrillas de colágeno, ácido hialurónico) son igualmente sensibles a la acción de los radicales libres, se induce así, una esclerosis y fibrosis del tejido de sostén que pierde su turgencia. Los ácidos nucleicos son particularmente sensibles a la acción de los radicales libres, el sitio de acción es el seno de la molécula del ADN (entre las bases puricas y pirimidicas) que conlleva a la ruptura de estas y las mutaciones correspondientes. Esta desnaturalización del ADN puede tener graves consecuencias sobre la transmisión o la replicación del mensaje genético, así como sobre la síntesis de proteínas.

Los radicales libres también reaccionan entre sí, cuando dos radicales se encuentran pueden compartir sus electrones desapareados y hacer con el par de electrones una unión covalente, por ejemplo, el radical superóxido al reaccionar con el radical libre del óxido nítrico forma el peroxinitrito $\text{O}_2^\cdot + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^\cdot$. A pH fisiológico el peroxinitrito reacciona con proteínas y se descompone en productos tóxicos que pueden incluir el ión nitronio (NO_2^+), bioóxido de nitrógeno (NO_2) y OH^\cdot , así que parte de la toxicidad de un exceso de NO puede deberse a su interacción con O_2^\cdot ; además el excedente de O_2^\cdot reacciona con H_2O_2 , iones hierro o iones cobre y forman más radicales hidroxilo (23).

Cuando por alguna razón aumenta en exceso la producción de radicales libres en el organismo y la capacidad en las defensas antioxidantes resulta ineficiente, se establece la situación conocida como estrés oxidativo, en la cual existe daño celular, que llega a ser muy severo y puede conducir a la muerte celular.

Normalmente en las células y en los organismos la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes se mantiene en equilibrio, de manera que la toxicidad del oxígeno solo se produce en estados patológicos o en el envejecimiento.

Para mantener este balance la mayoría de las células cuentan con sistemas protectores que evitan el incremento excesivo de especies reactivas de oxígeno clasificados en enzimáticos y no enzimáticos.

Dentro de los primeros lo conforman una batería enzimática como son: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa; además de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (24). La superóxido dismutasa (SOD), en la mitocondria, convierte al radical superóxido en agua oxigenada, esta enzima es dependiente de manganeso y en el citosol tiene como cofactores al cobre y al zinc. La glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa, constituyen el segundo gran sistema antioxidante celular, la glutatión peroxidasa, enzima citosólica cuyo cofactor es el selenio, transforma al peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua; participan en la reacción dos moléculas de glutatión reducido que ceden dos hidrógenos y se forma entre ellas un enlace disulfuro. El glutatión se regenera mediante la glutatión reductasa en presencia de NADPH. Finalmente la catalasa, enzima confinada a los peroxisomas, destruye al peróxido de hidrógeno por dismutación (Fig 2).

Dentro de los sistemas enzimáticos la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) tiene una participación esencial al regular el estrés oxidativo debido a que es la fuente más importante de NADPH (dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato), principal reductor intracelular requerido para la activación de varias enzimas antioxidantes (25).

En los sistemas no enzimáticos destaca el glutatión, es el triol no proteico más abundante en las células, su acción está acoplada a las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Otras moléculas protectoras son las vitaminas A, C, y E que se adquieren a través de la dieta. Ejercen su mecanismo de protección complementándose entre ellas; la vitamina E reacciona con los radicales libres, se forma un radical tocoferilo

que, por ser estable, suspende la cadena de reacciones. La vitamina C reacciona con el radical tocoferilo, regenera la vitamina E y queda como radical ascorbilo, también muy estable (26).

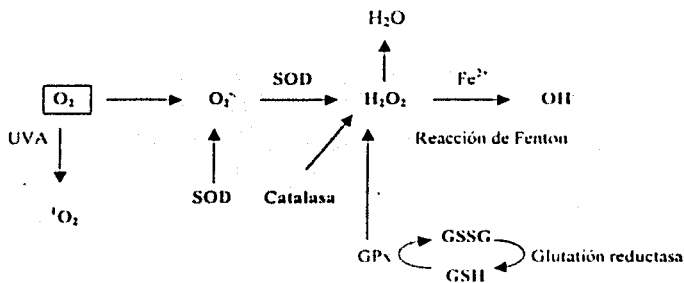


Figura 2. Detoxificación de radicales libres de oxígeno. Entre los sistemas antioxidantes que mantienen el estado redox de la célula se encuentran la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta al radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa fragmentan al H_2O_2 con la formación de agua (H_2O). El ciclo catalítico de la glutatión peroxidasa involucra la oxidación del glutatión (GSH). El glutatión oxidado (GSSG) regresa a su estado reducido por la glutatión reductasa. A partir de H_2O_2 y Fe^{2+} se genera el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), a esta reacción se le denomina reacción de Fenton (27).

6.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN DIABETES MELLITUS

En la DM el principal agente causal del estrés oxidativo es la hiperglicemia crónica, esta condición es el resultado de diferentes vías metabólicas alternas de la oxidación de la glucosa, que muy probablemente participan en la patogénesis de las complicaciones crónicas de la enfermedad como son, la vía de los polioles (28), la auto-oxidación de la glucosa, la glicosilación no enzimática y el metabolismo oxidativo (29).

Frances Maillard en el año de 1912 fue quien señaló la importancia de las modificaciones de las proteínas inducidas por carbohidratos en la patología humana (30). La reacción de Maillard facilita la producción de especies reactivas de oxígeno y el

decremento de la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn promoviendo el estrés oxidativo.

El mecanismo de glicosilación involucra la interacción de la glucosa y otros monosacáridos con las proteínas, sin la participación enzimática; ejemplo de esto es la hemoglobina glicosilada (HbAc), utilizada como método clínico en la evaluación de la glucemia diabética. Esta reacción altera la estructura, antigenicidad, catabolismo y función de las proteínas (31, 32)

Una vez que ocurre la condensación de los grupos aldehído y amino da como resultado la formación de un compuesto tipo base de Schiff (aldimina); debido a la inestabilidad de esta base puede haber un reacomodo molecular que se conoce como producto de Amadori (30) El tiempo de formación de dicho producto es relativamente corto, lo que permite su acumulación en las proteínas de vida media, corta y larga. Conforme la concentración de glucosa aumenta, la acumulación de los productos de Amadori se incrementan proporcionalmente. La fragmentación espontánea de estos compuestos forman la desoxiglucosona que reacciona con los grupos amino libres de las proteínas y forman uniones cruzadas conocidas como productos finales de glicosilación avanzada (PFGA) (Fig. 3) La mayoría de los PFGA son fluorescentes y el grado de fluorescencia se relaciona con la presencia de uniones cruzadas

En forma paralela, la glucosa, al igual que otros α hidroxiacidos y PFGA *per se*, generan por auto oxidación, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (23) (Fig. 4) Esta reacción es catalizada por metales de transición causando daño molecular y estructural a las proteínas (31, 32). Por otro lado, los productos de Amadori al reaccionar con las especies libres de oxígeno forman N-carboximetilislisima, este proceso también requiere metales de transición.

Otra de las vías generadoras de especies reactivas de oxígeno es la vía de los polioles o del sorbitol (Fig. 5), constituida por la acción secuencial de dos enzimas. La primera es la aldosa reductasa, que cataliza la conversión irreversible de glucosa en sorbitol y la segunda, la sorbitol deshidrogenasa responsable de la conversión reversible de sorbitol en fructosa. La enzima limitante en esta vía metabólica es la aldosa reductasa, que por tener baja afinidad para sus sustratos, sólo se activa de manera importante en presencia de un nivel intracelular alto de glucosa. La aldosa reductasa esta presente en la mayoría de los

tejidos, incluyendo aquellos en los que se desarrollan las lesiones crónicas de la diabetes como el cristalino, la retina, el endotelio vascular y los nervios. En estos tejidos el ingreso intracelular de la glucosa es independiente de insulina, facilitando con esto un aumento de la concentración intracelular de glucosa, misma que induce la activación de la vía de los polioles.

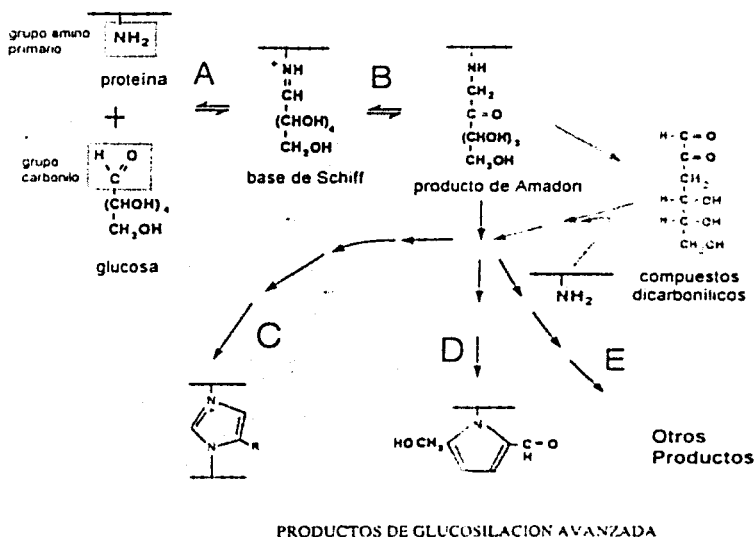


Figura 3. Esquema de reacción del proceso de glucosilación no enzimática de proteínas. (A) Formación de la base de Schiff; (B) Reordenamiento de Amadori. A través de una serie de reacciones complejas los productos de Amadori pueden originar derivados con estructura imidazólica (C) pirrólica (D) y otras diversas (iminas, furanos, piridinas, etc) (33).

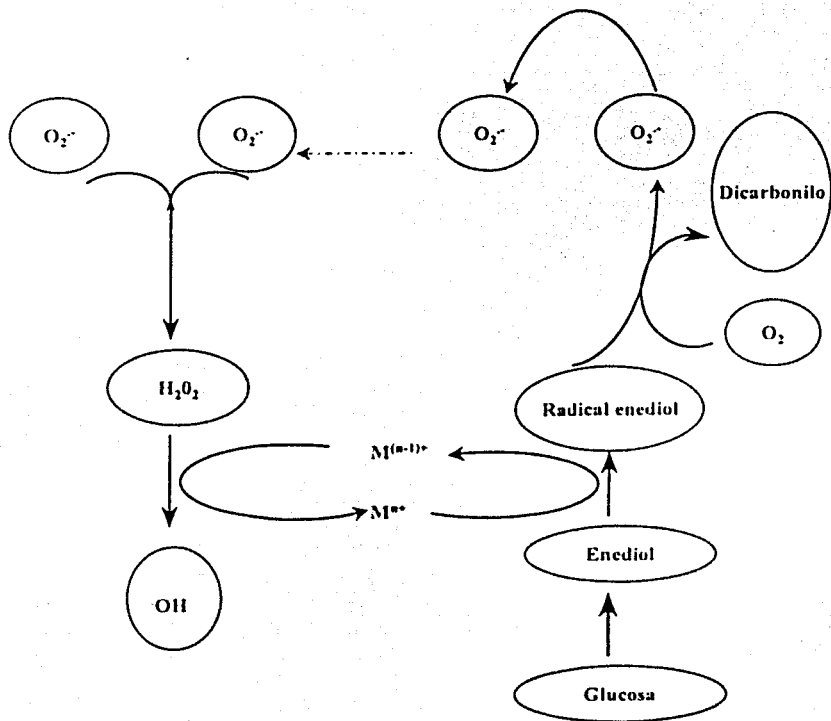


Figura 4. Autooxidación de la glucosa y formación de especies reactivas de oxígeno (34).

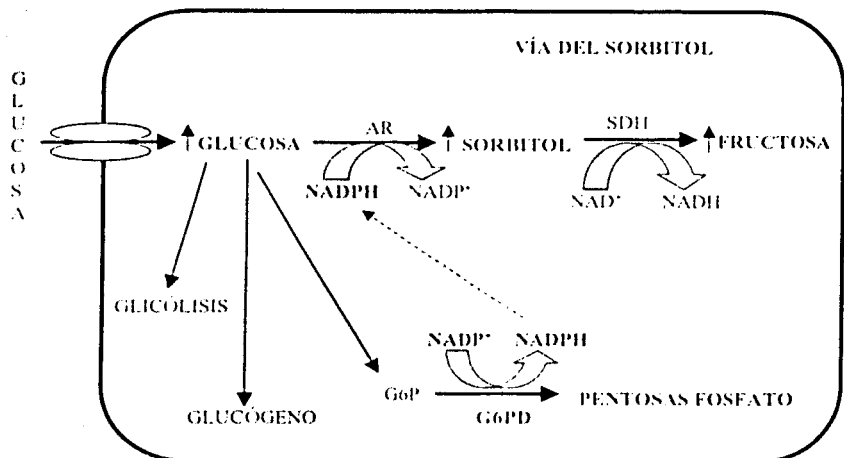


Figura 5. Activación de la vía del sorbitol, facilitada por la hiperglucemia y su impacto en las relaciones citosólicas de los nucleótidos de niacina ∇ NADPH/NADP⁺ y NADH/NAD⁺, así como en los incrementos de las concentraciones del sorbitol y fructosa. AR=Aldosa reductasa. SDH= Sorbitol deshidrogenasa (35)

Las consecuencias de la activación de esta vía, son la acumulación de sorbitol y fructosa. El primero es el responsable de generar estrés osmótico en los cristalinos, provoca que la célula se hinche, alterando la permeabilidad de la membrana y promueve cambios bioquímicos asociados con la formación de catarata. En el caso de la fructosa, al igual que la glucosa, aumenta el estrés oxidativo al formar productos de glicosilación avanzada. Otro punto a destacar es que en esta vía se consume el NADPH, requerido por otros sistemas antioxidantes y de esta manera acentúa el estrés oxidativo.

Por todo lo antes mencionado la glucotoxicidad es elemento clave en generar estrés oxidativo, lo que repercute en modificaciones de la estructura y funcionalidad de los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, induciendo de esta manera alteraciones metabólicas, en el crecimiento celular y de otros procesos fisiológicos celulares; por ello, se sugiere al estrés oxidativo como una de las causas centrales en la patología de la DM (12, 13).

7. GENERALIDADES DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

7.1. OXIDACIÓN DE LA GLUCOSA: RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

La ruta predominante del catabolismo de la glucosa es la glucólisis para dar piruvato, seguida por la oxidación a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico o de Krebs. Un proceso alternativo, es la vía de las pentosas fosfato, la cual actúa en diversos grados en las distintas células y tejidos. La función de esta ruta es fundamentalmente anabólica más que catabólica, actúa exclusivamente en el citosol teniendo dos funciones principales: 1) proporcionar el NADPH para la biosíntesis reductora y 2) proporcionar ribosa-5-fosfato para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Además, la ruta actúa para metabolizar las pentosas de la dieta, procedentes principalmente de la digestión de los ácidos nucleicos (36).

Podemos considerar a la ruta de las pentosas fosfato como un mecanismo que actúa en dos fases: oxidativa y no oxidativa. En la fase oxidativa la primera reacción es catalizada por la **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa** que oxida glucosa-6-fosfato a la correspondiente lactona. Esta lactona se hidroliza por una lactonasa específica a 6-fosfogluconato, que

experimenta una descarboxilación oxidativa, para dar CO_2 , NADPH y una pentosa fosfato, la ribulosa-5-fosfato. En la fase no oxidativa parte de la ribulosa-5-fosfato se convierte en otros azúcares de cinco carbonos, incluyendo la ribosa-5-fosfato, la cual puede utilizarse en la síntesis de nucleótidos o en el siguiente paso de la ruta de las pentosas. Enseguida una serie de reacciones convierten tres moléculas de azúcares de cinco carbonos en dos moléculas de un azúcar de seis carbonos y una molécula de un azúcar de tres carbonos. Algunos de estos azúcares se convierten en glucosa-6-fosfato, y el ciclo se repite (Fig. 6).

La ruta de las pentosas fosfato (Fig. 7) no es fundamentalmente una ruta de generación de energía. El destino real de los azúcares fosfato depende de las necesidades metabólicas de la célula en la que se está desarrollando la ruta. Si la necesidad principal radica en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, el principal producto es la ribosa-5-fosfato, y no se producen la mayor parte de los reordenamientos de la fase no oxidativa; si la necesidad principal es la generación de NADPH (para la síntesis de ácidos grasos y esteroides), la fase no oxidativa genera compuestos que pueden convertirse con facilidad en glucosa-6-fosfato, para el paso posterior de la fase oxidativa. Por último, una célula con necesidades moderadas de NADPH y de pentosas fosfato, la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato producidos en la fase no oxidativa pueden catabolizarse en mayor medida mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. Dadas las múltiples necesidades metabólicas de una célula para la biosíntesis, es improbable que ninguno de estos tres modos de actuación se emplee de manera exclusiva en una determinada célula (36).

7.2. REGULACIÓN DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

La G6PD es una enzima que pertenece al grupo de las enzimas lipogénicas. Esta familia de enzimas incluye a la ácido graso sintasa, acetil-coenzima A carboxilasa, ATP citrato liasa, enzima malica y G6PD, estas enzimas catalizan reacciones para la síntesis de novo de los ácidos grasos. En especial, la enzima G6PD es considerada como una enzima lipogénica debido a que provee el sustrato, NADPH, para la producción de palmitato por la ácido graso sintasa (37).

La G6PD es la enzima que limita la vía de las pentosas fosfato que además de proveer el NADPH genera precursores para la síntesis de los ácidos nucleicos. El gen de la G6PD en los mamíferos se localiza en el cromosoma X, tiene una extensión de 18 kb y

contiene 13 exones, es considerado como un gen que se expresa constitutivamente en varios tejidos y en especial en el tejido adiposo, el hígado, el pulmón y células que proliferan (37).

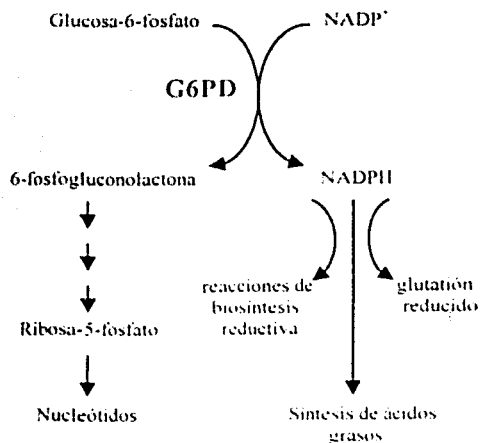


Figura 6. Participación de la G6PD en el metabolismo celular. La G6PD es la enzima que limita la vía de las pentosas fosfato y es la principal fuente generadora del poder reductor NADPH (38).

Este gen es modulado por diferentes estímulos externos incluyendo las siguientes hormonas: la insulina, el 17β estradiol, la dihidroepiandrosterona, la adrenalina, la cortisona y la tiroxina; así como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) que induce la expresión del gen de la enzima. Los carbohidratos en la dieta incrementan la síntesis de G6PD, en especial con glucosa seguida de sacarosa y fructosa, la magnitud de este incremento es determinada por la cantidad de carbohidratos consumidos, contrario a este efecto la presencia de ácidos grasos en la dieta puede inhibirla (38, 39).

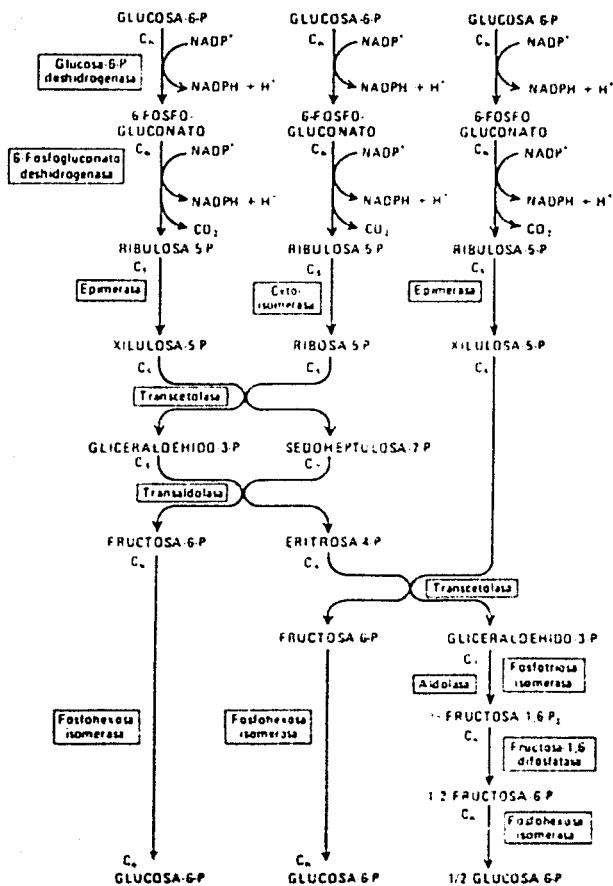


Figura 7. Vía de las pentosas fosfato (40).

Así como las hormonas y la dieta regulan la actividad de la enzima, el vanadato y el selenato inducen la expresión y actividad de la G6PD ya que mimetizan la acción de la insulina (41). Dentro del grupo de vitaminas hidrosolubles la nicotinamida y el ácido nicotínico induce la expresión del ARNm de la G6PD en células de Jurkat (42), este comportamiento también se observa con la forma oxidada de la vitamina C, reflejándose en el aumento de las concentraciones del glutatión e inhibición de la producción de H_2O_2 evitando de esta manera la muerte celular (43). Finalmente, es de mencionar que dietas deficientes en cobre incrementa las concentraciones la enzima en animales con diabetes experimental (44).

7.3. DEFICIENCIA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

La ruta de las pentosas es especialmente activa en la generación de poder reductor en los eritrocitos de los vertebrados y sin la participación de la G6PD no se podría llevar a cabo. La importancia de la actividad de la G6PD se puso de manifiesto mediante la investigación de un trastorno genético humano frecuente, el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Durante la segunda guerra mundial, se administró profilácticamente el fármaco antipalúdico primaquina a los miembros de las fuerzas armadas, como consecuencia de ello, una parte importante de los militares, en los que posteriormente se comprobó que existía un déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, presentaron una anemia hemolítica grave (destrucción masiva de los eritrocitos). Estos individuos eran sensibles también a diversos compuestos que, como la primaquina, generan un estrés oxidativo, que se manifiesta por la aparición de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos en los eritrocitos. En condiciones normales, los peróxidos se inactivan a través de la reducción del glutatión, que es el tripeptido γ -glutamiloilcisteinilglicina. El glutatión es abundante en la mayoría de las células, y gracias a su grupo tiol libre, constituye un importante mecanismo de protección frente al estrés oxidativo. El glutatión oxidado se reduce por la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH. En el eritrocito, una función especialmente importante del glutatión es la de mantener la hemoglobina en estado reducido (Fe^{2+}). Así pues, el eritrocito es especialmente sensible a la depleción del glutatión, y puesto que la ruta de las pentosas fosfato es prácticamente la única ruta de los eritrocitos para la generación de NADPH, el eritrocito es particularmente vulnerable a las

situaciones que deterioran el flujo a través de esta ruta y reducen, por tanto las concentraciones intracelulares de NADPH (36).

Al síndrome de deficiencia de la enzima en el humano se le conoce como favismo, enfermedad caracterizada por anemias hemolíticas y aumento en la sensibilidad oxidante del eritrocito. Los individuos con esta falla en condiciones de estrés oxidativo como son la ingesta de habas (*Vicia faba*) o la administración de drogas del tipo antipalúdico, antipiréticos y analgésicos (45), cursan con crisis hemolíticas. Los individuos con este déficit son asintomáticos hasta que se ven sometidos a un estrés oxidativo que genere una cantidad de peróxidos suficiente que agoten al glutatión reducido disponible. La reducción del glutatión oxidado resultante para producir de nuevo glutatión reducido se ve alterada, puesto que las concentraciones de NADPH son insuficientes para permitir la función de la glutatión reductasa. Ello hace que se acumule metahemoglobina (Fe^{2+}) a costa de la hemoglobina, lo que modifica la estructura de la célula, debilitando la membrana y haciéndola vulnerable a la ruptura o hemólisis (46).

7.4. IMPORTANCIA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA BAJO ESTRÉS OXIDATIVO

La G6PD es considerada como una de las enzimas antioxidantes intracelulares, más importantes de respuesta al estado redox, en un ambiente de estrés oxidativo incrementado (47, 48). Debido a que la enzima es la fuente principal en generar el NADPH requerido por otros sistemas antioxidantes como son: la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, así como el péptido glutatión. Las evidencias han demostrado, que la condición de estrés estriba principalmente a cambios en la actividad de la G6PD, siendo esencial la expresión del gen que codifica para la G6PD en la protección de la célula.

Dentro de los estudios que asocian la G6PD y estrés oxidativo destacan los realizados con células carentes del gen que codifica para la G6PD demostrándose por ser altamente sensibles al estrés oxidativo, como sucede con los endotelios vasculares que a falta de NADPH se acumulan especies reactivas de oxígeno y el resultado es la disfunción endotelial (48). De igual manera se observa con mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que la carencia del gen las hace sensibles a los oxidantes (24).

En cultivos celulares bajo estrés oxidativo el comportamiento de la actividad de la G6PD tiende a incrementarse mientras el glutatión disminuye. Cuando la G6PD alcanza su máxima pico el glutatión inicia su incremento. Este tipo de respuesta se considera como un adaptación celular en células expuestas a peróxido de hidrógeno o a drogas que disminuyen los niveles de glutatión reducido. Contrario a esto, en diabetes experimental y en cultivos celulares (49) expuestos a concentraciones altas de glucosa, la actividad de la G6PD disminuye significativamente es probable que el ambiente oxidativo generado por la hiperglicemia provoque cambios estructurales de la G6PD

8. NICOTINAMIDA

La *nicotinamida* o *niacinamida* pertenece al grupo de vitaminas hidrosolubles del complejo B, conocida como vitamina B₃ (Fig. 8) Se obtiene a través de la dieta, principalmente de origen animal (hígado, carne, pescado y aves), de granos integrales, panes y cereales enriquecidos, nueces y legumbres (10).

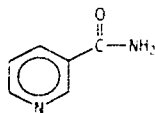


Figura 8. Estructura molecular de la nicotinamida (10)

La deficiencia de la nicotinamida (NA) conduce al padecimiento clínico conocido como pelagra (del italiano *pelle agra*, "piel arrugada") caracterizada por signos y síntomas atribuibles a la piel, el tubo digestivo y el sistema nervioso central, triada que suele denominarse "las tres D" o dermatitis, diarrea y demencia. La pelagra se conoce siglos atrás, y es propia de regiones donde se consumen grandes cantidades de maíz sin nixtamalizar. La cura de la enfermedad fue a finales de los años 30 cuando Elvehjem preparó un concentrado de hígado, identificando a la nicotinamida como la sustancia eficaz contra la pelagra (10).

El ácido nicotínico conocido como *niacina*, también tiene carácter vitamínico, funciona de manera idéntica a la nicotinamida. Si bien, la nicotinamida carece prácticamente de toxicidad, no ocurre lo mismo con el ácido nicotínico, que a partir de 50 mg es capaz de provocar sofocos y prurito. Así como, síntomas hepatotóxicos con dosis elevadas mantenidas durante cierto tiempo (3 g/día, durante un año) (10).

En el organismo, la nicotinamida es uno de los precursores de los nucleótidos de nicotinamida: NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida y adenina), NADP⁺ (fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina), NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido) y NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido), con funciones de coenzimas catalizando reacciones de oxidoreducción. Cabe mencionar que la producción de NAD⁺ también se lleva a cabo a partir de triptófano o ácido nicotínico. De esta manera, los requerimientos de nicotinamida de la dieta pueden satisfacerse por medio del ácido nicotínico y triptófano.

El principal órgano responsable de la homeostasis de la nicotinamida en suero, es el hígado, almacenándola en forma de NAD⁺ siempre y cuando aumente su concentración. Normalmente, el depósito de NAD⁺ es mucho mayor que su funcionalidad, por ello su concentración fluctúa dependiendo de la captación de nicotinamida, que a su vez está en relación con la concentración de nicotinamida sérica en ayuno. La hidrólisis de NAD⁺, mediante hidrolasas hepáticas, se obtiene la nicotinamida para su distribución a órganos extrahepáticos vía torrente sanguíneo (50, 51).

8.1. IMPORTANCIA DE LA NICOTINAMIDA EN DIABETES MELLITUS

La nicotinamida en DM ha sido objeto de numerosos estudios, principalmente en evaluar su efecto sobre la célula β pancreática. El efecto protector de la NA en la sobrevivencia y función de la célula β pancreática ha sido estudiado tanto en células aisladas como en el paciente diabético (52, 53). En diabetes experimental, se ha observado que previene el daño de la célula β pancreática inducido por estreptozotocina (54) y lo más importante es que frena o detiene la diabetes asociada con insulinitis (55). En ratas pancreatectomizadas la nicotinamida induce regeneración de la célula β pancreática del 90% previniendo de esta manera el desarrollo de la diabetes (56). Además, se le atribuye una acción preventiva en el desarrollo de la diabetes tipo 1, ya que al inhibir la Interleucina-

IP impide la acumulación del peroxinitrito, oxidante muy poderoso, a través de inducir la actividad de la enzima SOD dependiente de Mn (57). Otro ejemplo de protección, se observa en el modelo de ratón diabético no obeso, diabetes tipo 1, donde la nicotinamida reduce el número de células apoptóticas, retardando el desarrollo de la enfermedad (58). En cultivos de sangre periférica de pacientes con DM tipo 1 y una nueva variante de esta enfermedad, se ha observado que la presencia de nicotinamida inhibe la producción de Interleucina-12 y el Factor de Necrosis Tumoral α , sugiriendo que además de evitar la insulinitis también influye en la función de monocito macrofago (59).

El mecanismo molecular de protección de la nicotinamida sobre la célula β se atribuye por ser inhibidor de la poli (ADP)-ribosa sintetasa (60, 61), enzima asociada con la reparación del ADN, diferenciación celular y daño celular. Pocos son los estudios de la nicotinamida como antioxidante y como promotor de las concentraciones de los nucleótidos de nicotinamida. En particular, se ha demostrado que la nicotinamida induce el aumento del ARNm de la G6PD en cultivos celulares (42).

9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el paciente diabético, el principal factor del daño tisular es el estrés oxidativo, lo que causa el daño a biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Uno de los blancos de las especies reactivas son los grupos tioles, presentes en el sitio catalítico de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Partiendo de que la actividad de esta enzima se encuentra disminuida por un medio ambiente altamente oxidativo, donde es incapaz de generar el poder reductor en forma de NADPH, es de esperar que esto repercute en una variedad de vías metabólicas dependientes de NADPH, dentro de las que se encuentran los sistemas antioxidantes.

Si se administra un precursor de los nucleótidos de nicotinamida como la nicotinamida, probablemente se estimule la actividad de la G6PD, trayendo consigo la producción de NADPH y esto a su vez mejora los sistemas antioxidantes frenando la producción de especies reactivas.

10. OBJETIVOS

10.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la nicotinamida sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en diabetes experimental.

10.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 10.2.1. Estudiar las variaciones en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de hígado y páncreas en ratas bajo las siguientes condiciones: control, diabéticas, nicotinamida, diabéticas más nicotinamida y diabéticas más nicotinamida suplementadas con tres refuerzos de nicotinamida.
- 10.2.2. Determinar las concentraciones de glucosa e insulina bajo las condiciones antes mencionadas
- 10.2.3. Determinar el peso corporal y el peso húmedo de diferentes órganos.

11. HIPÓTESIS

La nicotinamida u otros productos de degradación de los nucleótidos de nicotinamida pueden estimular la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, de esta manera aumentar el potencial para producir NADPH requerido por los sistemas antioxidantes y frenar las complicaciones crónicas de la diabetes causadas por especies reactivas de oxígeno.

12. JUSTIFICACIÓN

El ser humano tiene un amplio espectro de necesidades individuales de suplementos esenciales que le permiten llevar una vida normal tanto en calidad como en duración. Algunos complementos dietéticos como la nicotinamida pueden ser de gran utilidad en mejorar la calidad de vida del paciente diabético. Es posible que este estudio conduzca a un mejor entendimiento de los mecanismos bioquímicos de la acción de la nicotinamida en organismos diabéticos y a la comprensión de los factores que regeneran la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esto puede ser útil en un futuro, por lo que en este estudio proponemos a la nicotinamida como un adyuvante terapéutico, no tan solo en el paciente diabético sino como medida de prevención para la enfermedad.

13. MATERIAL Y MÉTODOS

13.1. ANIMALES

Se utilizaron 50 ratas macho Sprague Dawley con un peso de 200 ± 50 g en condiciones de temperatura controlada y con un fotoperíodo de luz/oscuridad de 12 h, con agua y alimento (Purina rat chow) *ad libitum*. Los animales de estudio fueron distribuidos en cinco grupos (Fig. 9), cada uno conformado por 10 ratas distribuidas de la siguiente manera: A) control, B) nicotinamida, C) diabéticas, D) diabéticas más nicotinamida; y E) diabéticas más nicotinamida, suplementadas con tres refuerzos de nicotinamida a intervalos de 72 h. Al inicio y al final de cada fase experimental a todas las ratas se les determinó la concentración de glucosa en sangre (ver punto 13.4) y se efectuó el registro del peso corporal.

13.2. TRATAMIENTOS A LOS ANIMALES

Al grupo A solo se le administró el vehículo en el que fueron disueltos los fármacos, la vía de administración fue intraperitoneal en todos los casos. El grupo B recibió una dosis única de nicotinamida de 230 mg/kg (61) disuelta en solución salina al 0.9%. En los grupos C, D y E, la inducción de diabetes se realizó con una dosis única de estreptozotocina de 65 mg/kg (61) disuelta en un amortiguador de citrato de sodio 0.1M, a pH 4.5. Los grupos D y E, 15 min antes de administrar el fármaco inductor de la diabetes, recibieron nicotinamida a la dosis empleada para el grupo B. Al grupo E post-tratamiento se le administró tres refuerzos de nicotinamida (100 mg/kg) a intervalos de 72 h. La condición diabética se consideró cuando los valores de glucosa rebasaron los 150 mg/dL (Fig. 10).

13.3. OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS

Los animales fueron sacrificados 15 días después del inicio de cada fase, se anestesió con Ketamina (25 mg/kg), para la obtención de sangre total vía punción cardíaca donde se cuantificó insulina (ver punto 13.5). Posteriormente, se perfundieron con solución salina al 0.9% a través de la arteria aorta abdominal para eliminar restos de sangre (Fig. 11). Finalmente, hígado, páncreas, bazo, pulmón, riñones y corazón fueron removidos lavados, secados y pesados. Solamente hígado y páncreas se procesaron para cuantificar la

actividad enzimática. Los órganos restantes fueron exclusivamente utilizados para comprobar la pérdida de peso en diabetes experimental.

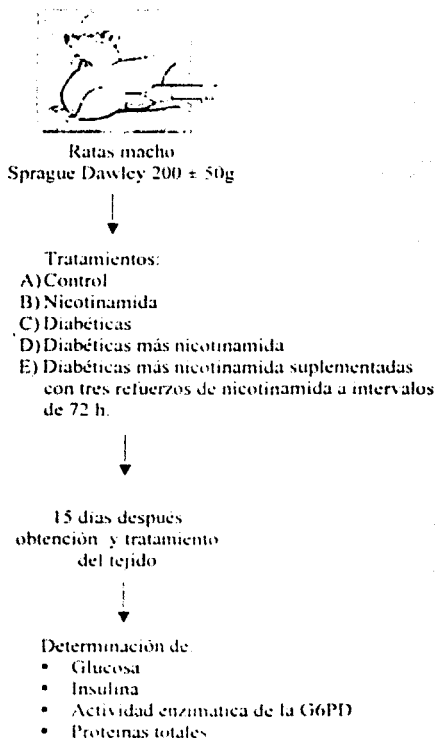
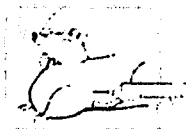


Figura 9. Esquema metodológico general. Se trabajó con ratas macho Sprague Dawley, conformando el trabajo por 5 grupos de 10 ratas cada uno. Después de 15 días se sacrificaron los animales para la obtención de los tejidos, los cuales fueron procesados para determinar los siguientes parámetros: glucosa, insulina, actividad enzimática de la G6PD y proteínas totales.



RATAS MACHO
200 ± 50 g

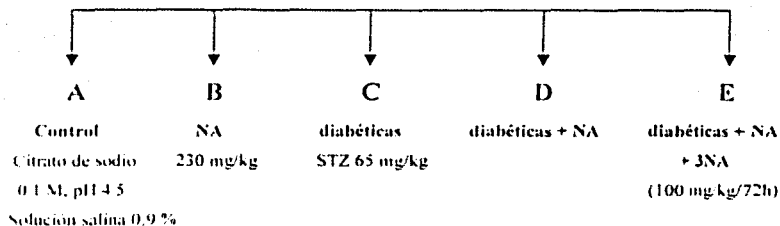


Figura 10. Tratamiento a los animales. El grupo A solo recibió los vehículos en los cuales se administraron los fármacos. El grupo B recibió una dosis única de 230 mg/kg de nicotinamida. La inducción de la diabetes en los grupos C, D y E se realizó con 65 mg/kg de estreptozotocina (STZ), a los grupos D y E, 15 minutos antes de la inducción, se le administró nicotinamida a la dosis del grupo B. El grupo E después de la inducción recibió tres refuerzos de nicotinamida de 100 mg/kg a intervalos de 72 h.

13.4. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Al inicio y al final de cada fase experimental se determinó la concentración de glucosa en sangre. Para ello, se utilizó un glucómetro digital ACCUTREND alpha (Roche), el cual determina la glucosa en sangre capilar fresca mediante fotometría de reflexión. Para la obtención de la muestra se realizó un corte pequeño en la parte final de la cola de cada rata, obteniendo una gota de sangre la cual se colocó en el aparato y se registró la concentración de glucosa en mg/dL.

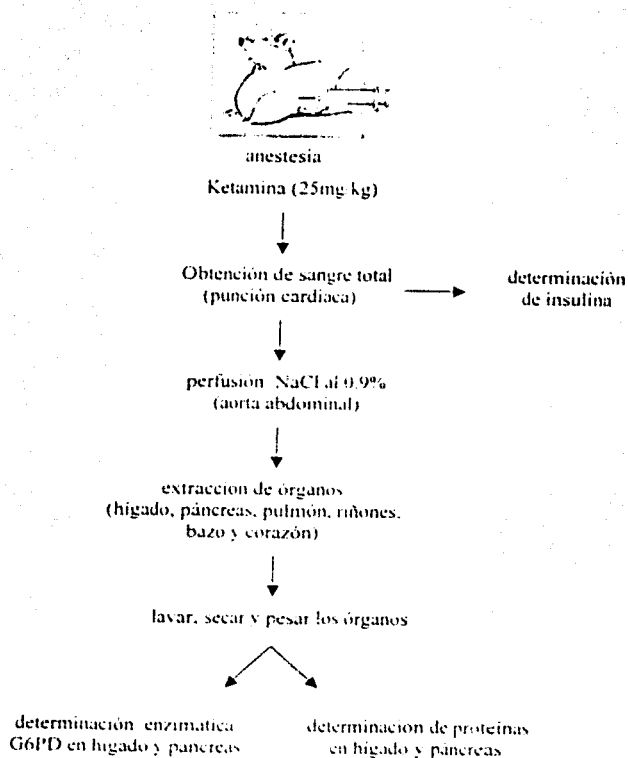


Figura 11. Obtención de los tejidos. 15 días después del inicio de cada fase se sacrificó a los animales, se anestesiaron con Ketamina (25 mg/kg), se obtuvo sangre total por punción cardiaca para la cuantificación de insulina y se extrajeron los órganos para comprobar su pérdida de peso húmedo en diabetes experimental. Solamente hígado y páncreas se utilizaron para la determinación enzimática de G6PD y proteínas.

13.5. CUANTIFICACIÓN DE INSULINA

La cuantificación de la insulina se llevó a cabo en el suero de la sangre obtenida por punción cardíaca, esta determinación se realizó por radioinmunoensayo con el estuche INSULIN-CT (CIS bio internacional). El fundamento de este ensayo se basa en la competencia entre la insulina radioactiva y la insulina de la muestra por un número limitado de anticuerpos fijos en el fondo de los tubos. Después de la incubación el indicador no fijado es fácilmente removido mediante un lavado. La cantidad de insulina marcada unida a los anticuerpos es inversamente proporcional a la cantidad de insulina no marcada presente en la muestra (Fig. 12).

METODO

Se agregaron 100 μ L de la solución estándar, controles y muestras a los tubos correspondientes recubiertos con anticuerpos antiinsulina porcina producidos en cobayo, se adiciono 1 mL de insulina- I^{125} a cada tubo, se mezcló suavemente y se incubo 18-20 horas a 18-25 °C cubriendo los tubos con parafilm. Posteriormente se aspiró el líquido y se lavó con 4 mL de agua destilada, la radioactividad remanente se midió con un contador de centelleo para radiaciones gamma calibrado con I^{125} . Para obtener la concentración de insulina en las muestras, las lecturas correspondientes se extrapolaron en la curva estándar.

13.6. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

Se preparó un homogenizado de hígado y páncreas al 10 % (p/v) en un amortiguador de PBS 0.1M, pH 7.5 con un homogenizador Polytron PT 1200, posteriormente se centrifugo a 15 000 g a 4 °C durante 30 minutos en una centrifuga BECKMAN AvantiTM 50 (Fig. 13). Se recupero el sobrenadante, con el cual se determino la actividad enzimática por el metodo de Beutler (62) (Fig. 14). Este metodo utiliza una mezcla de reaccion que contiene glucosa-6-fosfato y NADP⁺ como sustratos produciendose gluconato-6-fosfato y NADPH⁺, este ultimo es medido a una longitud de onda de 340 nm.

El cambio que produce en la densidad optica determina la actividad enzimatica de la G6PD por unidad de tiempo.



MÉTODO

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

• 2.50 mL de amortiguador de Trictanolamina, 0.1 M; pH 7.6	<i>Concentración en el ensayo</i> 86 mM
• 0.20 mL de Cloruro de magnesio, 0.1 M	6.9 mM
• 0.10 mL de glucosa-6-P, sal de sodio (10mg/mL)	1.0 mM
• 0.10 mL de NADP, sal de sodio (10mg/mL)	0.39 mM
• 0.10 mL de muestra de enzima	

La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro DU-64 Beckman a una longitud de onda de 340 nm, antes de agregar la muestra de la enzima se leyó un blanco de reactivos el cual indica la confiabilidad del sistema de reacción. A continuación se agregó la muestra tomando la lectura desde tiempo 0 y se procedió a monitorear cada minuto durante 10 min.

CÁLCULO

Para obtener la actividad de la enzima se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Actividad por volumen} = \frac{3.00}{6.22 \times 1.0 \times 0.1} \times \Delta E \cdot \text{min} = \text{U/mL de muestra}$$

donde: 3.00 = volumen final en la celdilla

6.22 = coeficiente de extinción

1.0 = paso de la luz por la celdilla

0.1 = volumen de la muestra

ΔE = cambio en la absorbancia

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{actividad por volumen}}{\text{concentración de proteínas}} = \text{U/mg de proteína}$$

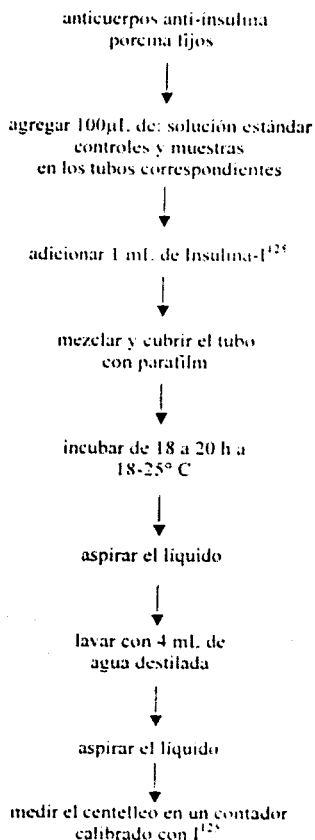


Figura 12. Cuantificación de insulina. La cuantificación de insulina en suero se realizó por radioinmunoensayo con el estuche INSULIN-CT (CIS bio internacional), el cual se basa en la competición entre la insulina marcada con I¹²⁵ que forma parte del estuche y la insulina no marcada de la muestra por anticuerpos antiinsulina porcina.

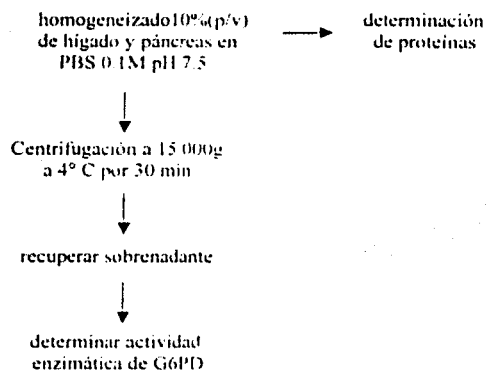


Figura 13. Procesamiento del tejido. Se preparo un homogeneizado al 10% (p/v) de hígado y páncreas del que se tomaron alícuotas para la determinación de proteínas por el método de Bradford (63), el homogeneizado restante se centrifugo a 15 000g a 4° C por 30 min y se recupero el sobrenadante, donde fue determinada la actividad enzimática por el método de Beutler (62).

13.7. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Previo a la centrifugación realizada para la medición de la actividad enzimática se alicuotaron muestras de los homogeneizados al 10 % (p/v) de hígado y páncreas, para cuantificar proteínas totales por el método de Bradford (63) (Fig. 15). Este método involucra la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 con las proteínas. El azul brillante de Coomassie tiene dos formas diferentes de color, rojo y azul. La forma roja es convertida a la forma azul después de su unión con las proteínas, esto produce un cambio en la absorción máxima del colorante (de 465 a 595 nm), este incremento es monitoreado para determinar la cantidad de proteínas.

REACTIVOS

- Reactivo de Bradford (ver apéndice)
- Solución estándar de albúmina (1mg/mL) (ver apéndice)

MÉTODO

Se tomó una alícuota de 10 μ L del homogenizado y se llevó a un volumen final de 100 μ L con PBS 0.1 M, pH 7.5, se agregaron 5 mL del reactivo de Bradford diluido y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, finalmente se registró la lectura de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro DU-64 de Beckman. La concentración de proteína de la muestra se obtuvo por interpolación en la gráfica de la curva estándar de albúmina bovina, siendo esta lineal. La realización de la curva estándar se detalla en la Tabla 3.

MEZCLA DE REACCIÓN

amortiguador de Trictanofamina 0.1 M pH 7.6	2.50 mL
MgCl ₂ 0.1 M	0.20 mL
Glucosa-6-P, sal de sodio (10mg/mL)	0.10 mL
NADP, sal de sodio (10mg/mL)	0.10 mL
Muestra de enzima	0.10 mL



absorbancia a 340 nm
desde tiempo 0 y cada minuto
hasta 10 min

Figura 14. Medición de la actividad enzimática de la G6PD. La medición de la actividad enzimática de la G6PD se realizó por el método de Beutler (62), usando glucosa-6-P y NADP⁺ como sustratos, produciéndose gluconato-6-P y NADPH⁺, este último se midió a 340 nm para determinar la actividad de la G6PD por unidad de tiempo.

13.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación estadística se realizó mediante la prueba de ANOVA.

Llevar 10 μ L de homogenizado
al 10% p/v a un volumen de 100 μ L con
PBS 0.1 M pH 7.5

↓
Adicionar 5 ml. del reactivo de
Bradford diluido

↓
Incubar por 5 min
a 1^oA

↓
Absorbancia a 595 nm

Figura 15. Determinación de proteínas. La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (63), este se basa en que el azul brillante de Coomessie tiene dos formas de color, de rojo pasa a azul tras la unión con las proteínas y el cambio que produce en la absorción se monitorea a 595 nm.

Tabla 3

Determinación de proteínas Absorbancia a 595 nm			
Tubo	Estandar μ L	Agua μ L	Bradford diluido ml.
Blanco	0	100	5
1	10	90	5
2	20	80	5
3	30	70	5
4	40	60	5
5	50	50	5
6	60	40	5
7	80	20	5
8	100	0	5

14. RESULTADOS

14.1. EFECTO DE LA NICOTINAMIDA SOBRE PESO CORPORAL Y LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA E INSULINA

En la Tabla 4, figuras 16, 17 y 18, se muestran las principales características metabólicas, 15 días post-tratamiento. El grupo que mostró el porcentaje más alto en la disminución de peso corporal fue el grupo diabético (41%) con respecto al grupo control. Las ratas diabéticas con nicotinamida fue del 23% y del 12% (grupo E). El grupo que recibió solo nicotinamida fue del 12%. El estado diabético fue confirmado por la concentración de glucosa sérica mostrando la concentración más alta el grupo diabético (511 ± 44.45), los tratados con nicotinamida tienden a disminuir parcialmente regresando a valores normales (146.89 ± 10.71) como es el caso del grupo que recibió los 3 refuerzos de nicotinamida (162.5 ± 10.32). El grupo con nicotinamida no presentó diferencias significativas. El comportamiento de las concentraciones de insulina fue a la inversa con respecto a la glucosa, los valores más altos correspondieron al grupo control (27.01 ± 3.79) y el grupo con nicotinamida sin mostrar diferencias significativas entre ellos, seguido de los dos grupos diabéticos con nicotinamida. Finalmente las ratas diabéticas mostrando valores significativos 3 veces menores que el control (9.8 ± 2.88). La disminución corporal en porcentaje fue similar en los pesos húmedos de los diferentes órganos (Tabla 5).

14.2. EFECTO DE LA NICOTINAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA G6PD

En la tabla 6, figura 19, se muestran las actividades hepáticas, señalando al grupo diabético por tener una actividad 3 veces menos (3.35 ± 1.65) comparada con el grupo control (9.75 ± 1.69), seguido de los grupos diabéticos con nicotinamida, el grupo que recibió los 3 refuerzos (7.46 ± 0.92) la actividad fue cercana al control. Las actividades en páncreas (Fig. 20) tuvieron un comportamiento similar al hígado la actividad más baja correspondió al grupo diabético (4.34 ± 1.68) con tendencia a una recuperación los grupos con nicotinamida. La actividad enzimática del grupo con nicotinamida (11.53 ± 2.17) no hubo diferencias significativas con respecto al control.

Tabla 4

Efecto de la nicotinamida sobre la ganancia de peso corporal y las concentraciones de glucosa e insulina			
	Peso (g)	Glucosa (mg/dL)	Insulina (UI)
A Control	337.93 ± 25.53	146.89 ± 10.71	27.01 ± 3.79
B Nicotinamida	297.85 ± 16.73	143.29 ± 12.57	29.4 ± 1.01
C Diabética	200.46 ± 24.50*	511 ± 44.45*	9.8 ± 2.88*
D Diabética + NA	260.57 ± 38.71	197.29 ± 45.29*	26.73 ± 3.87
E Diabéticas + NA + JR	298.4 ± 17.6	162.5 ± 10.32	24.43 ± 4.93

Los valores representan la media ± DS de 10 experimentos

* p < 0.001 comparado con los otros grupos (ANOVA)

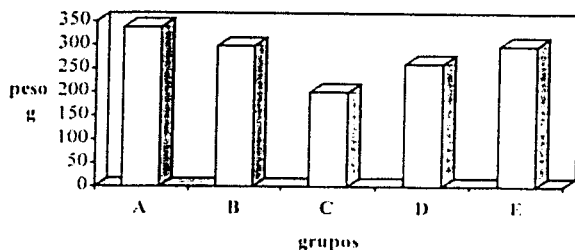


Figura 16. Efecto de la nicotinamida sobre el peso corporal en diabetes experimental. El peso de cada animal se registro antes del sacrificio, después de 15 días de iniciada cada fase. Los grupos son: A) control, B) nicotinamida, C) diabeticas, D) diabeticas + nicotinamida y E) diabeticas + nicotinamida suplementadas con 3 refuerzos de nicotinamida. Las barras representan la media \pm DS de 10 experimentos (Tabla 4).

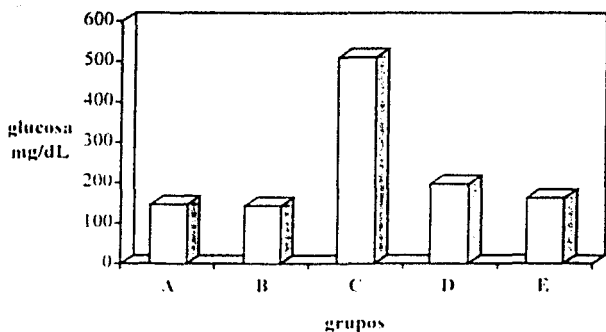


Figura 17. Efecto de la nicotinamida sobre la concentración de glucosa en diabetes experimental. La concentración de glucosa se midió 15 días posttratamiento. Las barras representan la media \pm DS de 10 experimentos (Tabla 4). Los grupos son: A) control, B) nicotinamida, C) diabéticas, D) diabéticas + nicotinamida y E) diabéticas + nicotinamida suplementadas con 3 refuerzos de nicotinamida.

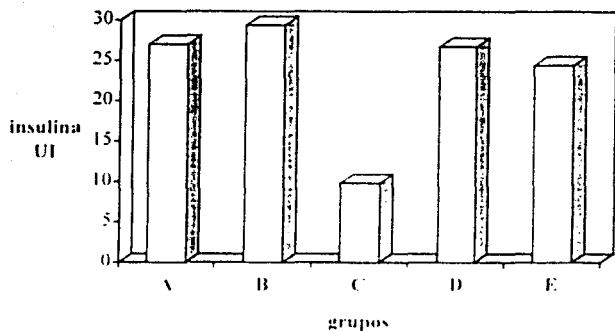


Figura 18. Efecto de la nicotinamida sobre las concentraciones de insulina en diabetes experimental. La concentración de insulina se midió por radioinmunoensayo, 15 días postratamiento. Las barras representan la media \pm DS de 10 experimentos (Tabla 4). Los grupos son: A) control, B) nicotinamida, C) diabéticas, D) diabéticas + nicotinamida y E) diabéticas + nicotinamida suplementadas con 3 refuerzos de nicotinamida.

Tabla 5

Efecto de la nicotinamida sobre el peso húmedo de diferentes órganos en diabetes experimental

Peso húmedo (g)	A control	B diabético	C Nicotinamida	D Diabéticas + NA	E Diabéticas + NA (3R)
Hígado	14.9± 1.5	9±1*	13.6 ± 0.6	13.7 ± 1.2	14.4 ± 1.7
Pulmón	1.7 ± 0.2	1.4±0.1*	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.1
Bazo	1.3 ± 0.2	0.7±3*	1.3 ± 0.2	1.2±0.2	1.7 ± 0.2
Pancreas	1.8 ± 0.6	0.9 ± 0.1*	1.4 ± 0.3	1.3±0.5	1.7 ± 0.3
Corazón	1.2 ± 0.1	0.8±0.1*	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1
R. derecho	1.5±0.2	1.1 ± 0.1*	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.1
R. izquierdo	1.3 ± 0.1	1.1±0.1*	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.1

Los valores representan la media ± DS de 10 experimentos

* p < 0.001 comparado con los otros grupos (ANOVA)

Tabla 6

Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

	A Control	B nicotinamida	C Diabética	D Diabética + NA	E Diabética + NA+3 R
Hígado	9.75 ± 1.69	10.04 ± 1.70	3.35 ± 1.65*	7.44 ± 0.71**	7.46 ± 0.92**
Páncreas	11.53 ± 2.17	11.22 ± 1.4	4.34 ± 1.68*	7.77 ± 1.43**	7.58 ± 1.37**

Los valores representan la media ± DS de 10 experimentos. La actividad se expresa en mU/mg de proteína

* p = 0.001 comparado con los otros grupos (ANOVA)

** p = 0.001 comparado con el grupo A y B

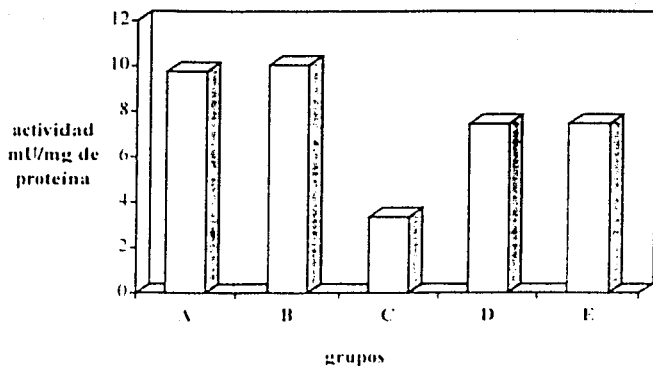


Figura 19. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hígado. Las barras representan la media \pm DS de 10 experimentos (Tabla 6). Los grupos son: A) control, B) nicotinamida, C) diabéticas, D) diabéticas + nicotinamida y E) diabéticas + nicotinamida suplementadas con 3 refuerzos de nicotinamida.

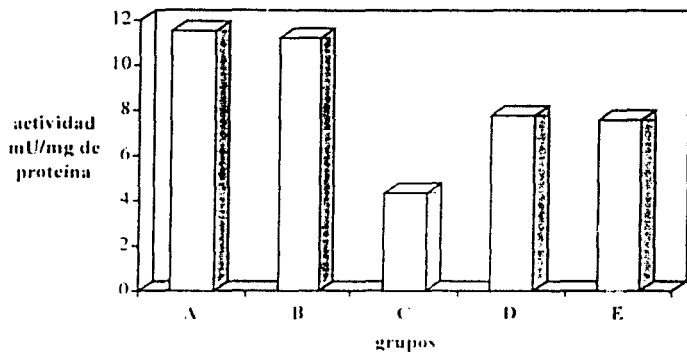


Figura 20 Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en páncreas. Las barras representan la media \pm DS de 10 experimentos (Tabla 6). Los grupos son: A) control, B) nicotinamida, C) diabéticas, D) diabéticas + nicotinamida y E) diabéticas + nicotinamida suplementadas con 3 refuerzos de nicotinamida.

15. DISCUSIÓN

La búsqueda por mejorar la calidad de vida del paciente diabético ha llevado a estudiar diferentes suplementos terapéuticos dentro de los que destaca la nicotinamida, vitamina hidrosoluble y precursor de los nucleótidos de nicotinamida. En los últimos años, la nicotinamida ha sido motivo de numerosos estudios demostrándose sus efectos benéficos en diabetes tipo 1 y tipo 2. Por ello es importante conocer más de cerca los mecanismos moleculares a través de los cuales la nicotinamida realiza sus acciones, además de estudiar diversos sistemas y parámetros con este fin. En este estudio los órganos de interés fueron el hígado y el páncreas, el primero por ser uno de los sitios en los que la enzima G6PD es afectada por diversos factores fisiológicos, así como el regulador homeostático del incremento de los niveles séricos de nicotinamida almacenándola en forma de NAD⁺, y el segundo por ser el lugar de síntesis de la insulina y de una posible intercomunicación entre órganos.

En nuestros resultados fue evidente que la administración de nicotinamida protegió contra los efectos de la estreptozotocina como son: la pérdida de peso, la hiperglicemia, y la hipoinsulinemia, lo que es consistente con los informes de Masiello y col (61).

Esta acción protectora de la nicotinamida pudiera ser explicada con base en las propiedades de la vitamina de manera general o más específica de la siguiente manera:

1) La nicotinamida es un inhibidor de la poli-ADP-ribosa polimerasa, enzima asociada con la reparación del DNA, diferenciación celular y daño celular. Cuando se lesiona el DNA la polimerasa se activa utilizando al NAD⁺ como sustrato y como consecuencia se consume el NAD⁺ celular originando la caída del ATP y finalmente la lisis celular; esto es causa de la disfunción de un alto porcentaje de las células β pancreáticas en animales tratados solo con estreptozotocina. La administración adicional de nicotinamida evita el consumo de NAD⁺ y la muerte de las células β pancreáticas, esto lo confirma nuestros datos al observarse la recuperación de las concentraciones séricas de insulina en los animales tratados con nicotinamida. En el hígado esta hormona tiene diversas acciones como es la de inhibir la gluconeogénesis, la glicogenólisis, la urogenesis y la cetogénesis, además de estimular la síntesis de ácidos grasos y proteínas. En general, reduce la salida de glucosa por medio de múltiples acciones que determinan cambios en la actividad de

algunas enzimas y la tasa de síntesis de otras enzimas hepáticas. Esto explica el porque de la hiperglicemia en las ratas insulínopénicas tratadas con estreptozotocina. Siendo bloqueada la sobreproducción de glucosa con nicotinamida regresando a valores normales los animales que además recibieron los tres refuerzos de nicotinamida.

2) La administración de nicotinamida a cultivos primarios de hepatocitos, se ha constatado que aumenta la replicación y sobrevivencia celular. El efecto de la nicotinamida, se atribuye en que abastece la poza de NAD^+ durante el cultivo del hepatocito *in vitro*. Esta información esta acorde con la recuperacion de peso corporal en los grupos que recibieron la nicotinamida, sin embargo, en el grupo que recibio solo nicotinamida se observo una disminucion del peso corporal. Esta inhibicion del crecimiento se atribuye a un aumento en la síntesis de N-metilnicotinamida dando como resultado una deficiencia de metionina y aumento de colina (64)

3) En diabetes experimental la concentración de NAD^+ esta disminuida debido a la presencia de cuerpos cetónicos que impide su síntesis limitando de esta manera la disponibilidad de los nucleótidos de nicotinamida y desregulando el metabolismo intermedario (51)

Estudios recientes avalan que la hiperglicemia es la causa principal del daño celular en la diabetes mellitus, dando como resultado un aumento del estrés oxidativo. En esta condición, la G6PD tiene una participación preponderante en regular el NADPH, principal reductor intracelular requerido por los sistemas antioxidantes. La G6PD es el paso limitante de la vía de las pentosas fosfato que además de generar NADPH también aporta precursores para la síntesis de ácidos nucleicos. La siguiente enzima de la vía de las pentosas es otra deshidrogenasa, la 6-fosfogluconolona deshidrogenasa productora de NADPH. Sin embargo, la actividad de la enzima es completamente dependiente de la G6PD, así la G6PD es la fuente única del sustrato para esta enzima (6-fosfogluconolona). Hay otra enzima que produce NADPH, la malato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ . En la mayoría de las células esta enzima no puede reemplazar a la G6PD como fuente principal de NADPH. Sin embargo en hígado, tejido adiposo, célula β pancreática y el macrófago la malato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ pudiera tener un papel significativo en la producción de NADPH. En el humano, la deficiencia de la G6PD esta asociada con el desarrollo de la diabetes.

Kurtz y Wells así como Nakamura y col. fueron los primeros en demostrar que la insulina induce la actividad de la G6PD en el hepatocito en cultivo. Estudios subsecuentes con ratas diabéticas y cultivos de hepatocitos tratados con insulina sugieren que la acción de la hormona regula la expresión de la G6PD a nivel de postranscripción (40, 65). No obstante de estos informes existen varias evidencias que sugieren que la insulina *in vivo* no puede regular directamente el nivel de esta enzima, dado que la cantidad de insulina requerida para producir un aumento significativo de la deshidrogenasa debe ser mayor que las dosis fisiológicas. La insulina, así como la dieta han sido implicadas en regular los niveles de la G6PD; la dieta con glucosa causa la liberación de insulina a partir del páncreas, es probable que la acción del carbohidrato sea secundaria al estimular la liberación de la hormona. En el caso de dietas con fructosa se obtiene una actividad muy baja de la glucocinasa, enzima que requiere insulina para su síntesis, es posible que la fructosa sea incapaz de causar la liberación de la insulina para mantener los niveles normales de la enzima. En contraste con la glucocinasa, la fructosa sí es capaz de aumentar los niveles de la G6PD al igual que la dieta con glucosa, ya que ambas producen concentraciones similares de la G6PD se puede especular que utilizan el mismo mecanismo el cual no involucra a la insulina. Adicional a estos trabajos se ha observado que además de la insulina y carbohidratos, la enzima es regulada por diversos factores, ejemplo de ello es la inducción de la actividad y expresión de la G6PD intrauterina por NADPH a nivel postranscripción (66, 67).

Nuestros resultados indican que la administración de nicotinamida fue capaz de mantener las actividades de la G6PD en su rango normal en hígado y páncreas. Por el contrario, en condiciones de hiperglucemia la actividad de la enzima disminuyó en ambos tejidos; concordando estos resultados, con las actividades hepáticas encontradas por otros investigadores (41, 49).

A pesar que se conoce, que el decremento de la funcionalidad de la G6PD pudiera resultar de su susceptibilidad al aumento del estrés oxidativo, el blanco molecular preciso se desconoce. Los modelos *in vitro* han contribuido en explicar la disminución de la actividad de la G6PD en diabetes experimental. Todo indica que su actividad depende de grupos tiolés (68) cercanos al sitio activo y de residuos de lisina (69) presentes en su sitio catalítico, el cual está expuesto de ser modificado por el ambiente celular.

En el síndrome diabético se han detectado sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico, marcador de lipoperoxidación que resulta de la interacción del radical hidroxilo (OH) con los lípidos, para formar aldehídos no saturados como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), principal producto de lipoperoxidación con varios efectos citotóxicos. Esto se ha demostrado durante la incubación de la G6PD (*Leucomonstoc mesenteroides*) en presencia de HNE, confirmando que esta pierde su actividad enzimática, ya que al reaccionar el grupo ϵ amino del residuo de lisina de la G6PD con una doble ligadura del HNE forman el aducto lisina-HEN (70). Además la exposición de fibroblastos con glicoxal y extractos crudos de hígado de ratón con 3-deoxiglucosona disminuye la actividad de la G6PD. Los dos son α oxoaldehídos involucrados en la formación de productos finales de glicosilación avanzada. El primero se forma por la degradación de glucosa, de proteínas glicosiladas y lipoperoxidación; y la 3-deoxiglucosona resulta de la fragmentación de la fructosa 3- fosfato y de la degradación de proteínas glicosiladas. También se ha observado en la célula β pancreática, los endoteliales de aorta y el tejido adiposo expuestos a concentraciones altas de glucosa aumentan las concentraciones de cAMP el cual a su vez causa la conversión de una proteína cinasa dependiente de él a su forma activa resultando la fosforilación e inactivación de la G6PD (49). Estas modificaciones a las que está expuesta la G6PD explican la disminución de la actividad en los animales diabéticos.

En el presente estudio somos los primeros en demostrar que la nicotinamida mantiene la actividad de la G6PD contra las modificaciones antes mencionadas. En parte puede deberse a la secreción de insulina de un páncreas remanente, así como al aumento del reservorio de NAD⁺ por ser la nicotinamida su precursor. Tanto en el eritrocito como en *Leucomonstoc mesenteroides* la G6PD es protegida por NAD⁺, NADP⁺ y glucosa-6-fosfato contra agentes oxidantes al dar estabilidad estructural a la enzima. Sin embargo se requieren estudios futuros para demostrar si la nicotinamida tiene la capacidad de inducir la expresión de la enzima.

16. CONCLUSIONES

La nicotinamida ejerce efectos protectores contra el estado diabético inducido por la estreptozotocina, como son:

- Induce la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa tanto en hígado como en páncreas.
- Disminuye de la concentración de glucosa sanguínea.
- Incrementa la concentración de insulina.
- Previene la pérdida de peso corporal.

Los resultados de este trabajo nos hacen pensar en la nicotinamida como una alternativa terapéutica a mediano plazo, ya que previene notablemente los efectos de la diabetes en animales de experimentación y hasta hoy no ha demostrado ser tóxica.

17. APÉNDICE

17.1. LISTA Y PREPARACIÓN DE REACTIVOS

17.1.1. Citrato de Sodio 0.1 M, pH 4.5

Se disolvieron 29.41g de Citrato de sodio (Merck) en 900 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 4.5 y se aforó a 1 litro.

17.1.2. Cloruro de magnesio 0.1M

Se disolvieron 9.52 g de cloruro de magnesio (Sigma) en 1 litro de agua destilada.

17.1.3. Estreptozotocina (Calbiochem)

17.1.4. Glucosa-6-Fosfato (10 mg/mL)

Se disolvieron 10 mg de glucosa-6-fosfato, sal de sodio (Sigma) en 1 mL de TEA.

17.1.5. Ketamina (Sector Salud)

17.1.6. NADP⁺ (10 mg/mL)

Se disolvieron 10 mg de NADP⁺, sal de sodio (Sigma) en 1 mL de TEA.

17.1.7. Nicotinamida (Sigma)

17.1.8. PBS 0.1M, pH 7.5

Se disolvió: 8.2 g de Cloruro de sodio (Merck)

0.156 g de Cloruro de potasio (Merck)

1.15 g de Fosfato de sodio monobásico (Merck)

0.342 g de Fosfato de potasio dibásico (Merck)

en 900 mL de agua destilada, agitando hasta su disolución. Se ajustó el pH a 7.5 y se aforó a 1 litro.

17.1.9. Reactivo de Bradford

Se disolvió 100 mg de Azul brillante de coomassie G-250 (Sigma) en 50 mL de etanol (Merck) al 95%. Se agregaron 100 mL de ácido fosfórico concentrado (Merck) y se añadió agua destilada a un volumen final de 200 mL. Este colorante se diluyó 1:5 en agua destilada y se filtro

17.1.10. Solución estandar de albúmina (1 mg/mL)

Se pesaron 10 mg de albúmina bovina fracción V (Sigma) y se disolvieron en 10 mL de agua destilada.

17.1.11. Solución salina 0.9% (Sector Salud)

17.1.12. Trietanolamina (TEA) 0.1 M, pH 7.6

Se disolvieron 18.56 g de Trietanolamina (Sigma) en 900 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7.6 y se aforo a 1 litro.

18. BIBLIOGRAFÍA

1. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus (1997) *Diabetes care* 20:1183-1193
2. Secretaría de salud (1994) Encuesta nacional de enfermedades crónicas México: Secretaría de salud.
3. Secretaría de salud (2000) Encuesta nacional de enfermedades crónicas México: Secretaría de salud Reporte. 1-60
4. Secretaría de salud Mexico (2001) Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. Reporte 9886
5. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus (1997) *Diabetes care* 20:1183-7
6. Alberti KJ *et al* (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of WHO consultation. *Diabetic Med* 15: 539-53
7. Sociedad Andaluza de Medicina de Familia y Comunitaria. Grupo de trabajo sobre diabetes. Guía de diabetes para atención primaria. <http://www.cica.es/ahens/samfyc/>
8. American Academy of Family Physician. Diagnosis and management of type 2 diabetes (monograph) http://www.aafp.org/atp/monograph/199901_text.html
9. Mendez JD, Ramos HG. Diabetes mellitus experimental. *En: Ciencia veterinaria*. Chan, M R. (Ed). Fac. Med. Vet., UNAM, Mexico, 1989, pp 914-927
10. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Panamericana, 1996, Cap. 51, 62
11. Anderson T, Schem P (1974) Correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Inv* 54: 672-677
12. Elsner M, Guldbakke B (2000) Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43: 1528-1533
13. Nyoun Soo Kwon, Sung Haeng Lee (1994) Nitric oxide generation from streptozotocin. *F.I.S.E.B.J.8*: 529-533

14. 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 (1993) *N Engl J Med* 329: 977-986
15. Carrington AL (1999) The aldose reductase pathway and nonenzymatic glycation in the pathogenesis of diabetic neuropathy: a critical review for the end of the 20th century. *Diabetes* 7 (4): 101-125
16. Steffes MW, Mauer SM (1990) Pathophysiology of renal complications. In: Rifkin H PJ D, ed. *Diabetes mellitus theory and practice*. New York: Elsevier Science Publishing 16: 257-263
17. Gugliucci A (2000) Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev Med Uruguay* 16: 58-75
18. Baynes JW (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412
19. Oberley LW (1988) Free Radicals and diabetes. *FreeRadical Biol Med* 5: 113-124
20. Zentella M, Saldaña BY (1996) Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioq* (México) 152-161
21. Clavel JP, Emerit J (1985) Lipidoperoxidation et radicaux libres. Rôle en biologie cellulaire et en pathologie. *Path Biol* 33 (1): 61-69
22. Dormandy TL (1989) Free radical pathology and medicine. A review. *J.R. Coll Physicians Lond* 22 (4): 221-227
23. Southorn PA, Powis G (1988) Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63 (4): 381-389
24. Izawa, Kimura A (1998) Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 330: 811-817
25. Krebs E (1974) The regulation of the pentose phosphate cycle. *Biochem J* 138: 425-435
26. Rice-Evans CA, Burdon RH (1994) Free radical damage and its control. *Elsevier* 28:122-124

27. Morel Y, Barouki R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342: 481-496
28. Soulis-Liparota T, Cooper M, Dunlop M, Jerum G (1995) The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia* 38: 387-394
29. Nishikawa T, et al (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-790
30. Monnier VM, Sell DR, Magaraj RH, Odetti P (1993) Maillard reaction and oxidative stress are interrelated stochastic mechanisms of aging. *Free radicals: From Basic Science to Medicine* 157- 174
31. Wells-Knecht M, Thorpe S, Baynes J (1995) Pathways of formation of glucoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry* 15: 134-141
32. Gugliucci A (1994) Advanced glycation of rat liver histone octamers: an in vitro study. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 588-593
33. Gonzalez F, Castello RP (2000) La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. <http://www.cienciaelCiencia.MiDia volumen3 numero2 articulo/articulo2.html>
34. Hunt J, Smith C, Wolf SP (1990) Autooxidative glycosylation and possible involvement of preoxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39: 1420-1424
35. Carrington AL, Litchfield JE (1999) The aldose reductase pathway and nonenzymatic glycation in the pathogenesis of diabetic neuropathy: a critical review for the end of the 20th century. *Diabetes reviews* 7(4): 101-123
36. Mathews C K, Van Holde K E (1996) Procesos oxidativos: ciclo del ácido cítrico y ruta de las pentosas fosfato. En: *Bioquímica*. 2da edn. Mc Graw Hill, España. pp 563-571
37. Kletzien R, Harris P, Foellmi L (1994) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* 8: 174-181

38. Salati LM, Amir-Ahmady B (2001) Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Annu Rev Nutr* 21:121-140
39. Rudaack D, Chisholm EM, Holten D (1970) Rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 246: 1249-1254
40. Rodwel MM *Bioquímica de Harper* 8^a ed. El Manual Moderno. México, D.F., 1982. pp 174-180
41. Berg EA, Wu JY, Campbell L, Kagey M, Stapleton SR (1995) Insulin-like effects of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochimie* 77: 919-924
42. Qing Yan, Carol B (1999) The NAD⁺ precursors, nicotinic acid and nicotinamide upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA in Jurkat Cells. *Biochem Biophys Res Comm* 255: 133-136
43. Puskas F, Gergely P JR, Banki K, Perl A (2000) Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB J* 14: 1352-1361
44. Mc Dermott BM (1994) Effects of copper deficiency and experimental diabetes on tissue antioxidant enzyme levels in rats. *Ann Nutr Metab* 38: 263-269
45. Bilmen S, Aksu E, Canatan D (2000) Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta* 303: 83-86
46. Gaskin RS, Estwick D, Peddi R (2001) G6PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus. *Ethn Dis* 11 (4): 749-754
47. Leopold J, Loscalzo J (2000) Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PD expression in smooth muscle cells. *Am J Botany* 279: H2477-H2485
48. Leopold J, Cap A, Scribner A, Loscalzo J (2001) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J* 15: 1771-1773
49. Zhang Z, Apse K, Stanton R (2000) High glucose inhibits glucose-6-phosphato dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cell. *J Biol Chem* 275: 40042-40047

50. Bernofsky C (1980) Physiologic aspects of pyridine nucleotide regulation in mammals. *Mol Cell Biochem* 33: 135-143
51. Shin M, Maeda S (1995) NAD synthesis from nicotinic acid by the hepatocytes prepared from diabetic rats. *J Vit Nutr Res* 65: 143-146
52. Polo V, Pontiroli A (1998) Nicotinamide improves insulin secretion and metabolic control in lean type 2 diabetic patients with secondary failure to sulphonylureas. *Acta diabetol* 35
53. Pozzilli P, Ghirlanda G (1997) Vitamin E and nicotinamide have similar effects in maintaining residual beta cell function in recent onset insulin-dependent diabetes (the IMDIAB IV study). *Eur J Endocrinology* 137: 234-239
54. Hu Y, Wang Y, Wang L, Li Y (1996) Effects of nicotinamide on prevention and treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Chin Med J* 11: 819-822
55. Yamada K, Tsurii S (1982) Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. *Diabetes* 31: 749-753
56. Kurup S, Bhande RR (2000) Combined effect of nicotinamide and streptozotocin on diabetic status in partially pancreatectomized adult B6B/c Mice. *Hum Metab Res* 32: 330-334
57. Andrade J, Conde M, Bedoya J (1996) Protection from nicotinamide inhibition of interleukin-1 β -induced RIN cell nitric oxide formation is associated with induction of MnSOD enzyme activity. *Endocrinology* 137: 4806-4810
58. Brown A, O'Brien (2000) Nicotinamide prevents the development of diabetes in the cyclophosphamide-induced NOD mouse model by reducing beta-cell apoptosis. *J Pathol* 191: 86-92
59. Kretowski A, Mysliwiec J (2000) Nicotinamide inhibits enhanced in vitro production of interleukin-12 and tumor necrosis factor- α in peripheral whole blood of people at high risk of developing type 1 diabetes and people with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 47 (2): 81-86
60. Wilson GL (1984) Mechanisms of streptozotocin and alloxan induced damage in rat B cell. *Diabetologia* 27: 587-591

61. Masiello P, Broca CH, Ribes G (1998) Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 43: 224-229
62. Beutler E (1975) Red Cell Metabolism. In: A Manual of Biochemical Methods, 2edn. New York Grune & Stratton 66-139
63. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
64. Handler P, Dann WJ (1942) The inhibition of rat growth by nicotinamide. *J Biol Chem* 146: 357-368
65. Manos P, Nakayama R, Holten D (1991) Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis and mRNA abundance in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 15 (276) 245-250
66. Smith E, Barker K (1974) Effects of estradiol and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate on the rate of synthesis of uterine glucose 6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 249: 6541-6547
67. Smith E, Barker K (1977) Effects of estradiol and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate on the rate of degradation of uterine glucose 6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 252 (11) 3709-3714
68. Valentine WN, Paglia DE (1981) Effect of chemical modification of sulfhydryl groups of human erythrocyte enzymes. *Am J Hematol* 11 (2) 111-124
69. Bautista JM, Mason PJ, Luzzatto L (1995) Human glucose-6-phosphate dehydrogenase Lysine 205 is dispensable for substrate binding but essential for catalysis. *FEBS* 366: 61-64
70. Friguet B, Szveda LL, Stadtman ER (1994) Susceptibility of glucose-6-phosphate dehydrogenase modified by 4-hydroxy-2-nonenal and metal-catalyzed oxidation to proteolysis by the multicatalytic protease. *Arch Biochem Biophys* 311 (1) 168-173