



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultat de Medicina

Análisis de la relación del genotipado y marcadores de estrés oxidativo con la presencia y grado de vasculopatía periférica en pacientes con diabetes tipo 2.

TESIS DOCTORAL:

Presentada por:

José Francisco Folgado Montesinos

Dirigida por:

Dr. Juan F. Ascaso Gimilio

Dr. José T. Real Collado



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina

Juan F. Ascaso Gimilio, Doctor en medicina y Catedrático de Universidad del Departament de Medicina de la Universitat de València y José T. Real Collado, Doctor en medicina y Profesor Titular del Departament de Medicina de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que D. José Francisco Folgado Montesinos, licenciado en medicina, ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral titulada: “Análisis de la relación del genotipado y marcadores de estrés oxidativo con la presencia y grado de vasculopatía periférica en pacientes con diabetes tipo 2”, y que reúne todos los requisitos para ser presentada y defendida para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, 18 de Septiembre de 2014.

Fdo. Dr. Juan F. Ascaso

Fdo. Dr. José T. Real

Un principio central en la ciencia y la medicina es que cuanto mayor es la cantidad de datos independientes que coinciden, más convincente es la validez de la hipótesis o un diagnóstico. Lo opuesto también es cierto: la información discrepante genera incertidumbre.

Robert M. Cohen y Christopher J. Lindsell.

AGRADECIMIENTO

El doctorado y todo lo que conlleva; la investigación, la experiencia y el esfuerzo me otorga una satisfacción continua, siempre con la colaboración y el respaldo de mi mujer, que ha conseguido que mantenga este proyecto más activo si cabe.

Esta tesis no saldría a la luz si no la dedicase a aquellas personas que contribuyeron con esta investigación. La confianza que los pacientes han depositado siempre en mí y la oportunidad que ello me da, es de profunda gratitud. Reconocer también el conocimiento, la orientación y la motivación que me han regalado el profesor Dr. Juan Francisco Ascaso y el Dr. Francisco Javier Chaves junto a la receptividad y los consejos del profesor Dr. José Tomás Real, sin los cuales no podría escribir este reconocimiento.

Agradecer también el entusiasmo y el esfuerzo generoso de Geles, Luz, María, Vanesa y Vero.

Para finalizar, dar las gracias a mis hijas: Sara y Marta.

ÍNDICE GENERAL

LISTADO DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. IUSTIFICACIÓN	5
2.1 Vasculopatía periférica.	7
2.2 Hiperglucemia y resistencia a la insulina.	8
2.3 Factor de riesgo lipídico: dislipemia diabética.	9
2.4 Hipertensión arterial e hipercoagulabilidad.	11
2.5 Lipoproteína (a).	12
2.6 Homocisteína.	13
2.7 Estrés Oxidativo. Inflamación.	13
2.8 Genética y epigenética de la diabetes tipo 2	15
3. SINOPSIS	17
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	25
6. METODOLOGÍA	29
6.1 Sujetos.	31
6.2 Diseño.	31
6.3 Método.	31
6.3.1 Entrevista clínica.	31
6.3.2 Exploración clínica.	32
6.3.3 Parámetros bioquímicos.	35
6.3.4 Estudio genético de estrés oxidativo.	36
6.4 Métodos estadísticos.	36
7. RESULTADOS	37
7.1 Marcadores biológicos de riesgo.	39
7.2 Polimorfismos relacionados con estrés oxidativo.	45
7.3 Marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes.	46
8. DISCUSIÓN	53
8.1 Población General.	55
8.1.1 Población y parámetros generales.	55
8.1.2 Enfermedad arterial periférica como marcador de arteriosclerosis y mortalidad.	55
8.1.3 Parámetros clínicos.	56
8.1.4 Perfil lipídico.	57
8.1.5 Homocisteína y polimorfismo genético.	58
8.1.6 Parámetros bioquímicos.	59
8.1.7 Polimorfismo genético: xantinaoxidasa.	60
8.2 Estrés oxidativo.	61
8.2.1 Parámetros descriptivos del subgrupo.	62
8.2.2 Parámetros lipídicos.	63
8.2.3 Homocisteína.	64
8.2.4 Correlaciones.	64

8.3 Limitaciones.	64
9. CONCLUSIONES	67
10. BIBLIOGRAFÍA	71

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACC/AHA: American College of Cardiology/American Heart Association.
ADA: American Diabetes Association.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
AGE: Advanced Glycation Endproducts.
AP-1 y 2: Proteína activadora 1 y 2 (factores de transcripción heterodiméricos).
APO A: Apolipoproteína A.
APO B: Apolipoproteína B.
CAAT: Controlled amino acid therapy.
CAT: Catalasa.
CBS: Cistationina sintetasa.
CEPT: Proteína transportadora de ésteres de colesterol.
CIV: Claudicación intermitente vascular.
CK-MB: Creatin-fosfo-cinasa isoenzima del músculo cardíaco.
CT: Colesterol total.
DM2: Diabetes mellitus tipo 2.
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial.
GPX: Glutación peroxidasa.
GSH: Glutación.
GSR: Glutación reductasa.
GSS: Glutación trasferasa.
GSSG: Disulfuro de glutatión.
GWAS: Genome Wide Association Studies.
HbA1c: Hemoglobina glucosilada.
HDL: High density lipoprotein.
HPLC (UV): High-performance liquid chromatography (ultraviolet).
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1.
IGF-1 y 2: Insulin Growth Factor 1 y 2.
IL(1,2,4,6,8): Interleucinas (1,2,4,6,8).
IMC: Índice de masa corporal.
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.
ITB: Índice tobillo-brazo.
LDL: Low density lipoprotein.
Lp(a): Lipoproteína (a).
LRT: Lipoproteínas ricas en triglicéridos.
MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos- 1.
MDA: Malonildialdehído.

MDRD: Modification of diet in renal disease.

MPT: Proteína de transferencia microsómica.

MTHFR: Metilentetrahidrofolato reductasa.

NADH/NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada/reducida.

NCEP-ATP III: Programa nacional de educación sobre el colesterol. Panel de tratamiento del adulto.

NDS: Neuropathy Disability Score.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal.

NO: Óxido nítrico.

Nrf 1 y 2: Factor respiratorio nuclear 1 y 2.

NSS: Neuropathy Symptoms Score.

O₂⁻: Anión superóxido.

OH: Grupo hidroxilo.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1.

PAMP: Pathogen Associated Molecular Proteins.

PCR: Proteína C reactiva.

pK_a: Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida.

PPAR: Receptor activado de la proliferación de peroxisomas.

PRR: Pathogen Recognition Receptors.

RAGE: Receptor for advanced glycation endproducts.

REALIST: Residual Risk, Lipids and Standard Therapies.

ROS: Reactive Oxygen Species.

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad.

SNP: Polimorfismos de nucleótidos simples.

SOD: Superóxido dismutasa.

SP1BP. Sp-1 binding protein. (Sp-1: factor de transcripción humano).

STENO: Estudio Steno Diabetes.

TASC-II: Transatlantic intersociety consensus II.

TBARS: Sustancia reactiva al ácido barbitúrico.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alpha.

TxA₂: Tromboxano.

UKPDS: Estudio Prospectivo sobre la Diabetes en el Reino Unido.

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1.

VLDL: Very low density lipoprotein.

VP: Vasculopatía periférica.

XO: Xantina oxidasa.

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Marcadores biológicos de riesgo.

Tabla 1. Características generales del grupo.

Tabla 2. Medias de ITB.

Gráfica 1. Distribución por géneros.

Tabla 3. Parámetros clínicos.

Gráfica 2. Distribución por hábito tabáquico.

Tabla 4. Prevalencia de HTA.

Tabla 5. Perfil lipídico.

Tabla 6. Prevalencia de dislipemia.

Tabla 7. Tratamiento para la dislipemia.

Tabla 8. Parámetros bioquímicos en diabéticos relacionados con VP.

Gráfica 3. Episodios cardiovasculares.

Tabla 9. Prevalencia de retinopatía.

Tabla 10. Prevalencia de vasculopatía.

Tabla 11. Prevalencia de polineuropatía.

Tabla 12. Tratamiento con antidiabéticos orales.

Tabla 13. Tratamiento con insulina.

Polimorfismos relacionados con estrés oxidativo.

Tabla14. Recuento polimorfismos genéticos. Xantinoxidasa xo-337A>G.

Tabla15. Recuento polimorfismos genéticos. Xantinoxidasa xo-565+64T>C.

Tabla 16. Recuento polimorfismos genéticos. Xantinoxidasa xo-1936A>G.

Tabla 17. Recuento polimorfismos genéticos. Homocisteína MTHFR 1298.

Tabla 18. Recuento polimorfismos genéticos. Homocisteína MTHFR 677.

Tabla 19. Recuento polimorfismos genéticos. Homocisteína CBS 1080.

Marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes.

Tabla 20. Valores de referencia.

Tabla 21. Características descriptivas del subgrupo.

Tabla 22. Tabla comparativa por ITB.

Tabla 23. Distribución del género y factores de riesgo cardiovascular en los sujetos estudiados. Parámetros cualitativos I.

Tabla 24. Prevalencia de complicaciones micro- y macroangiopáticas en los sujetos estudiados. Parámetros cualitativos II.

Tabla 25. Análisis de correlación de GSH.

Tabla 26. Análisis correlación de GSSG.

Tabla 27. Análisis correlación de MDA.

Tabla 28. Análisis correlación de homocisteína.



1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica con un importante impacto sanitario por su alta prevalencia, las complicaciones que conlleva y su elevada mortalidad (1).

La diabetes tipo 2 (DM2) es su forma de presentación más frecuente, el 90- 95% del total de casos de la diabetes mellitus. Se caracteriza por ser una alteración metabólica poligénica y multifactorial. Simplificar la DM2 como un trastorno de la utilización de la glucosa (disminución de la secreción de insulina, aumento de la producción de glucosa hepática y disminución de la captación de glucosa por el músculo) nos aparta de una visión más global. No podemos olvidar que afecta también al metabolismo lipídico con aumento de ácidos grasos libres, capaz de causar o agravar los fenómenos anteriores.

Los datos epidemiológicos actuales acerca de la DM2 a nivel mundial, muestran que se trata de una enfermedad en auge. La variabilidad de su prevalencia entre distintas zonas geográficas es alta, y generalmente las poblaciones con un estilo de vida más occidental o que se han industrializado rápidamente son las más afectadas. Hay varias razones implicadas en este incremento de la diabetes a nivel mundial: el cambio en los criterios diagnósticos y las mejoras en el cribado, el aumento de la obesidad, los cambios dietéticos y de actividad física sobre un genotipo que la predispone y el envejecimiento de la población. Las proyecciones previstas suponen incrementos mayores del 100% (2). Estas previsiones pueden quedarse incluso cortas si tenemos en cuenta que la prevalencia de la obesidad, factor de riesgo para el desarrollo de la DM2, aumenta de forma considerable. Al mismo tiempo la edad de diagnóstico de la enfermedad se ha adelantado de forma significativa, alcanzando cifras de diagnóstico elevadas incluso en la población infantil (2). La DM2 afecta aproximadamente al 5-10% de la población europea, con especial incremento de la prevalencia (hasta un 25%) en mayores de 75 años (1). España no escapa a este aumento paulatino de la prevalencia de la enfermedad, con unas cifras estimativas del 10-14% y del 19,3% para mayores de 75 años y se sitúa entre los países con prevalencia media-alta. Esta prevalencia puede modificarse en España ya que disponemos de escasa información sobre los flujos migratorios y parece ser que se manifiesta en estas poblaciones a edades más tempranas y con control metabólico peor.

Gran proporción de personas afectadas de DM2 en España desconocen que la padecen (3) y uno de los datos más preocupantes de la detección tardía, como veremos después, es el alto índice de complicaciones crónicas presentes en el momento del diagnóstico.

En España el coste de la diabetes asciende, como mínimo a 5.809 millones de euros, lo que representa más del 8% del gasto sanitario global del estado (4), resultados congruentes con los datos del Sistema Nacional de Salud de España. Como elementos comunes destaca el notable crecimiento del gasto en los últimos años, el cual se ha quintuplicado en España. Por tanto en un futuro la DM2, siguiendo estas previsiones, se puede convertir en la enfermedad que más coste provoque al sistema sanitario español.

Las estadísticas globales de salud en general tienden a subestimar el número de muertes

debidas a DM2. En España es la tercera causa de muerte en mujeres y la séptima en varones; pero se debe corregir en función del riesgo conocido que desempeña la diabetes como causa reconocida de enfermedad coronaria y cerebrovascular (5). El 70-75% de los diabéticos mueren por complicaciones macrovasculares.

Podemos concluir que si a la magnitud y prevalencia añadimos la aparición casi ineludible de sus complicaciones y el coste económico, nos encontramos, sin duda alguna, con un problema de salud pública de primera magnitud.

A grayscale photograph of a person's arm being prepared for a blood pressure measurement. A dark-colored blood pressure cuff is wrapped around the upper arm. A white Minidop device, connected to a coiled stethoscope, is held against the arm. A hand is visible holding a manual sphygmomanometer gauge, which is connected to the cuff. The background is plain white.

2. JUSTIFICACIÓN

La diabetes se asocia con una aceleración de la enfermedad macrovascular de tipo arteriosclerótico que afecta a las arterias del miocardio, el cerebro y las extremidades inferiores, por lo que en los pacientes con DM2 las complicaciones se adelantan a edades más tempranas.

Desde el punto de vista histopatológico, las lesiones arterioscleróticas del diabético tienen un mayor contenido lipídico y más complicaciones trombóticas que la de los no diabéticos. Al mismo tiempo, en el diabético, la arteriosclerosis es difusa, afecta a un mayor número de vasos y se desarrolla de manera más rápida, extensa y precoz, incidiendo por igual en ambos sexos (6). El riesgo de padecer lesiones ateromatosas de grandes vasos es también elevado en los sujetos con prediabetes, en quienes las complicaciones macrovasculares, especialmente, la cardiopatía coronaria isquémica puede preceder a la aparición de la DM2. Se ha descrito que la prevalencia de la cardiopatía coronaria isquémica en DM2 recién diagnosticada puede ser igual o mayor que entre los que ya se saben diabéticos desde hace años (7).

Diferentes meta-análisis confirman que el riesgo relativo de mortalidad es superior con diabetes tras ajustar por edad, presión sistólica, niveles de lípidos y hábito tabáquico; sobre todo en las mujeres (8). El riesgo cardiovascular del diabético es triple que el del no diabético y aumenta significativamente las complicaciones y la mortalidad, generando un elevado número de ingresos hospitalarios e incrementos de costes sociales y sanitarios. El padecer diabetes parece ejercer un efecto independiente y multiplicador sobre la incidencia de cardiopatía isquémica. Esto ha llevado a la American Heart Association a considerar la diabetes como una enfermedad cardiovascular; así mismo, en las recomendaciones del NCEP-ATP III se considera la diabetes como un riesgo equivalente de enfermedad coronaria. Esta aseveración sin embargo, después de los años sigue siendo controvertida, posiblemente por el efecto que la edad, sexo, duración de la diabetes o enfoque de tratamiento ejerce sobre la morbilidad cardiovascular en el paciente con DM2.

Esta importante afectación cardiovascular se debe a la frecuente coexistencia de los factores principales de riesgo cardiovascular con otros propios de la diabetes. En la diabetes existen factores de riesgo propios como, la hiperglucemia, el hiperinsulinismo y la dislipemia diabética. Todos ellos promueven disfunción endotelial, un estado de inflamación crónica y el incremento del sustrato protrombótico que finalmente desarrolla arteriosclerosis (7).

2.1 Vasculopatía periférica.

La vasculopatía periférica (VP), expresión local de una arteriosclerosis sistémica, es un factor independiente del incremento de mortalidad cardiovascular (9).

En la DM2 la vasculopatía periférica es más temprana, más distal, más frecuente y grave. Además, esta complicación es la principal causa de amputación en el paciente con

DM2. La hiperglucemia es el factor cuantitativo que más se asocia con la VP, ya que por cada aumento del 1% de hemoglobina glucosilada se produce un incremento del 25% en el riesgo de VP. Estos hallazgos resaltan la importancia de establecer un diagnóstico precoz, tanto para limitar el avance de la enfermedad como para reducir el riesgo de mortalidad cardiovascular por cualquier otra causa.

Su forma asintomática confiere similar riesgo cardiovascular. La mayoría de los pacientes con VP son asintomáticos, sobre todo si son diabéticos; lo que dificulta la detección, más aún, en caso de ausencia de otras manifestaciones de enfermedad cardiovascular.

La medida más usada para su detección en la clínica diaria es el índice tobillo-brazo (ITB). Este índice se mide mediante doppler y se considera la mejor prueba inicial individual para detectar la VP. Este cociente es fácil, barato, preciso y reproducible; presenta una especificidad que roza el 95% para un valor $<0,90$. Se correlaciona bien con la gravedad de la obstrucción y pronostica su evolución. Sin embargo, el ITB no se relaciona tanto con la alteración funcional.

Se observa una relación inversa entre el ITB y el riesgo de morbilidad y mortalidad a los cinco años, de tal forma que existe un 10% de incremento en el riesgo relativo por cada descenso del 0,1 del valor del ITB. La utilidad de esta técnica queda limitada, en la DM2, porque son frecuentes las calcificaciones arteriales que provocan resistencia a la compresibilidad y falsean los resultados.

Para facilitar la detección de VP las directrices de la ADA, entre otras guías, recomiendan su realización para prevenir complicaciones. Por tanto, podemos considerar al ITB patológico como una manifestación de la VP así como de arteriosclerosis generalizada, acelerada y sistémica en el diabético (7).

2.2 Hiperglucemia y resistencia a la insulina.

Afirmando como premisa que los principales factores de riesgo cardiovasculares en el diabético coinciden con la población no diabética; la DM2 es un factor de riesgo independiente y multiplicador. Se conoce que la incidencia de complicaciones cardiovasculares, según meta-análisis de estudios prospectivos de cohorte, se incrementa en un 16% por cada 1% de incremento de HbA1c (10).

Existen dos factores que no se encuentran en la población no diabética: el hiperinsulinismo y la hiperglucemia. Ambos se identifican como factores predictivos de riesgo cardiovascular en DM2. Los dos pueden provocar alteraciones vasculares nocivas con efecto memoria, es decir persisten a pesar de restaurarse la normoglucemia tras un período prolongado de hiperglucemia (11).

La hiperglucemia prolongada es causante por un lado de glucosilación de las proteínas y por otro de un aumento del estrés oxidativo que facilita la aterogénesis. Los productos finales de la glucosilación conocidos como AGE son estables y se unen a proteínas

presentes en las células endoteliales, células musculares lisas y macrófagos, mediante receptores RAGE. La unión con estos receptores desencadena una serie de reacciones que interfieren en la configuración molecular, actividad enzimática y las vías catabólicas de las proteínas, además de inducir más estrés oxidativo y disfunción endotelial. Se observa que la hiperglucemia crónica es causante de un importante aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este estrés oxidativo en las proteínas es proporcional a la concentración de glucosa en plasma, lo que hace que en los diabéticos mal controlados la oxidación de lipoproteínas sea un fenómeno frecuente con repercusión en las arterias, como veremos más adelante. Las consecuencias son el aumento de la permeabilidad vascular y angiogénesis, mayor actividad procoagulante, alteración del flujo por vasoconstricción, expresión de genes proinflamatorios y de moléculas de adhesión que contribuyen al desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes (12).

Los efectos de la insulina sobre la aterogénesis se atribuyen a sus variadas acciones fisiológicas, consecuencia de la resistencia hormonal y el hiperinsulinismo compensador resultante. Es posible un elemento de confusión por la asociación de la resistencia insulínica con los factores clásicos que acompañan al síndrome metabólico; recordemos que aproximadamente el 80% de la DM2 reúne criterios de síndrome metabólico. La resistencia a la insulina en la DM2 a través de distintos mecanismos, como el TNF- α , LDL oxidada, lípidos ricos en triglicéridos, la misma hiperglucemia, aumento de AGE entre otros, estimulan el factor nuclear de activación de la transcripción kappa B (NF- κ B) en células endoteliales, mononucleares y células del músculo liso, responsable de la transcripción de genes regulados. Finalmente, esto confluye en una disfunción de la producción de óxido nítrico y aumento de endotelina; que conlleva una inflamación crónica con aumento de citocinas, PCR y actividad favorecedora de la coagulación (13).

2.3 Factor de riesgo lipídico: dislipemia diabética.

La dislipemia ha demostrado ser en la DM2 uno de los principales factores pronósticos de enfermedad cardiovascular. En el UKPDS es el principal factor pronóstico cardiovascular y en el estudio STENO-2 se demuestra la importancia del control de la dislipemia sobre los otros parámetros estudiados. Finalmente, es conocido que para cada valor de colesterol en sangre la tasa de mortalidad de los pacientes con DM2 está entre tres y cinco veces superior (14).

En la DM2 se observa un tipo particular de dislipemia, de dos a tres veces más frecuente que en la población general, que puede preceder años a la aparición de hiperglucemia. Se caracteriza por aumento de triglicéridos y partículas LDL pequeñas y densas; disminución de HDL, elevación de apolipoproteína B y lipemia postprandial prolongada (15). Las alteraciones en las partículas LDL y HDL junto al cociente CT/HDL son los factores con más peso predictivo de episodios cardiovasculares.

La alteración más frecuente en DM2 es la elevación plasmática de las partículas VLDL, que se expresan por hipertrigliceridemia plasmática, y que se debe a un aumento de la síntesis hepática junto a una disminución de su catabolismo. Esta alteración no es exclusiva de la DM2, pero si es constante su asociación con insulinoresistencia o hiperinsulinismo. En esta situación la concentración de ácidos grasos libres se eleva y promueve la síntesis hepática de triglicéridos. Simultáneamente, por la insulinoresistencia se produce un aumento de la expresión hepática de apoproteína B, que junto a la situación anterior desarrolla sobreproducción hepática de partículas VLDL enriquecidas en triglicéridos. A esto hay que añadir la disminución del catabolismo vía lipoproteína lipasa. En la DM2 como situación de resistencia a la insulina se produce en el hígado un aumento de la MPT (proteína de transferencia microsómica) que junto con lo referido explica la sobreproducción de VLDL. Estas partículas VLDL anómalas y en mayor número, como hemos visto tienen un catabolismo anormal, aumentando el tiempo de la dislipemia postprandial y su actividad aterógena.

Las partículas LDL presentan una composición anormal con incremento de la concentración de triglicéridos y de la proporción colesterol/apoB. Estas partículas, conocidas como patrón o fenotipo B, presentan mayor capacidad aterógena. En la DM2 quizás son más importantes las características cualitativas de las LDL que su concentración plasmática, que se eleva escasamente a causa de la propia DM2. Esta modificación del cociente proteína/lípido con reducción del tamaño conlleva: disminución del catabolismo mediante su receptor, facilita atravesar el endotelio y es sustrato fácil para su oxidación y fagocitación por los macrófago.

La insulinoresistencia se acompaña de disminución de la síntesis de ApoA-1 y aceleración del catabolismo de las partículas HDL, por mayor actividad de la lipasa hepática y de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CEPT), lo que se traduce en descenso de la concentración plasmática de HDL y de su capacidad antiaterogénica (16).

Las alteraciones cualitativas y cuantitativas de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT) juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedad coronaria. Los niveles de LRT han sido confirmados como un factor de riesgo cardiovascular en los sujetos con diabetes: en primer lugar mediante meta-análisis en donde los niveles de triglicéridos son factores de riesgo de cardiopatía isquémica en varones; en segundo lugar al observar que estas partículas pueden penetrar en la pared arterial e iniciar o agravar el proceso aterogénico, también es conocida la relación positiva de los triglicéridos con factores como el PAI-1 o el factor VIIa de la coagulación y finalmente la constatación de la relación metabólica entre LRT, niveles bajos de partículas HDL y LDL anormalmente pequeñas y densas.

No sorprende que el aumento de apoB, índice indirecto del incremento del conjunto de lipoproteínas aterogénicas, haya demostrado tener alto valor predictivo de enfermedad cardiovascular, incluso en diabéticos con colesterol normal.

Además en situación de hiperglucemia, al permanecer más tiempo en circulación las

partículas LDL, tienen más posibilidades de sufrir procesos de glucosilación no enzimática y formación de AGE. Esta situación induce, como hemos visto antes: estrés oxidativo, disfunción endotelial e inflamación crónica. En definitiva inestabilidad de la placa de ateroma y trombosis.

Por otro lado, en la diabetes es frecuente que coexistan otras alteraciones del metabolismo lipídico tanto de origen primario o bien secundario como por ejemplo la nefropatía que empeora las anomalías lipídicas, eleva los niveles de Lp(a) en plasma o ambas.

2.4 Hipertensión arterial e hipercoagulabilidad.

La prevalencia de la hipertensión en la DM2 es superior a la observada en la población general después de ajustarla a la presencia de nefropatía. Subrayar que la hipertensión es frecuente en diabéticos con microalbuminuria y puede estar presente en individuos con distinto grado de intolerancia a la glucosa.

La causa de la hipertensión arterial en la diabetes no está bien establecida y puede ser múltiple. Deben de existir mecanismos comunes que lleven a su aparición conjunta o secuencial. Como hipótesis se postula que, en ausencia de disfunción renal, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia son factores comunes de ambas condiciones (17); y posiblemente por predisposición genética multifactorial/poligénica. Otras posibilidades son la presencia de alteraciones en el sistema renina-angiotensina-aldosterona y en ocasiones la arteriosclerosis acelerada con estenosis de la arteria renal.

Se trata de un factor principal de riesgo cardiovascular independiente. El impacto de la coexistencia de DM2 e hipertensión es importante, triplicando el riesgo de mortalidad por accidente cardiovascular en comparación con individuos no diabéticos (14). En el estudio UKPDS 38, el control estricto de la hipertensión reduce sustancialmente la mortalidad: por cada 10 mmHg de descenso de la presión arterial sistólica se asocia una reducción del 12% para cualquier complicación de la diabetes, 15% de reducción de mortalidad y 11% para infarto agudo de miocardio.

Aparte de los clásicos y conocidos factores hemodinámicos desfavorables existen en la DM2 situaciones particulares. La disminución de la elasticidad vascular, acelerada en DM2, por alteración de la matriz extracelular provoca incremento de la velocidad de la onda del pulso anterógrada y retrógrada produciendo aumento de la presión de pulso con efectos deletéreos sobre el endotelio y perfusión reducida coronaria. Se ha observado, además, en pacientes con resistencia a la insulina una vasodilatación alterada dependiente del NO ya en fases muy precoces. A consecuencia de ello se favorece la proliferación de células del músculo liso, peroxidación lipídica, aumento de la agregación de las plaquetas, expresión de moléculas de adhesión y estrés oxidativo.

El diabético, como hemos comentado, muere en la mayoría de los casos por trombosis. Sabemos que cuando se produce la rotura de la placa de ateroma arterial; en el

proceso trombotico se observan dos componentes esenciales, las plaquetas y la generaci3n de fibrina. El desarrollo del trombo depende de factores procoagulantes y antitromb3ticos y del equilibrio entre activadores e inhibidores del plasmin3geno.

La diabetes se considera un estado pro-coagulante por aumento de la expresi3n del factor tisular, de la actividad del PAI-1 regulada en parte por la insulina y el estado inflamatorio cr3nico. Es conocido que la disfunci3n endotelial merma las propiedades anticoagulantes del endotelio; se describen importantes alteraciones de la funci3n de las plaquetas como la s3ntesis de tromboxano (TxA2), la propia dislipemia diab3tica que colabora en el estado procoagulante, sin olvidar las frecuentes elevaciones de la Lp(a) que posee similitud con el plasmin3geno.

No es de extrañar en la DM2, una hipercoagulabilidad latente que se relaciona con fen3menos de aterotrombosis, responsable final de las complicaciones isqu3micas coronarias y cerebrales.

2.5 Lipoprote3na (a).

La lipoprote3na (a), que conocemos desde hace medio siglo, parece tener propiedades aterog3nicas y tromboticas. Su funci3n es desconocida, se comporta como un reactante de fase aguda y antioxidante. Se ha descrito que puede tratarse de una mol3cula que contribuye en la reparaci3n de la agresi3n a tejidos o comportarse como una vitamina antioxidante alternativa a la vitamina C.

Est3 formada por la uni3n de la apoprote3na (a) y apoprote3na B de una lipoprote3na LDL por un puente disulfuro. La apo(a) muestra cinco dominios ricos en ciste3na conocidos como kringles, el cuarto presenta alta homol3g3a con el plasmin3geno, por lo que interfiere en la fibrinol3sis y favorece la trombosis.

Para su cuantificaci3n conocemos diversos m3todos que no carecen de problemas, derivados de la gran variabilidad interindividual en el tamaño del complejo macromolecular y su homol3g3a con el plasmin3geno.

Posiblemente sea el factor de riesgo hereditario m3s prevalente; su concentraci3n est3 determinada gen3ticamente pero influenciada por la dieta (3cidos grasos insaturados, especialmente los trans) y factores hormonales (estr3genos, hipotiroidismo...). No est3 claro si la resistencia a la insulina o DM2 influyen en su concentraci3n.

La Lp(a) se asocia a episodios vasculares principalmente en estudios transversales (18). Pero esta asociaci3n est3 en discusi3n, de hecho, se señaala que su valor aumentado no supone incremento importante de riesgo si se alcanza control estricto de LDL.

Podemos concluir que no existen estudios que confirmen el beneficio de reducir su concentraci3n; en gran medida por falta de tratamientos efectivos, variaciones inter-3tnicas y dificultades metodol3gicas; por tanto, la utilidad en la pr3ctica cl3nica de medirla se reduce a pacientes con enfermedad cardiovascular no explicable por otros factores.

2.6 Homocisteína.

Las concentraciones elevadas de homocisteína se asocian con un aumento de complicaciones tromboembólicas arteriales, entre ellas la VP. Esta asociación es gradual y continua.

La elevación de su concentración se debe básicamente a déficit nutricional, tabaquismo, enfermedades crónicas y defectos genéticos en enzimas o cofactores. La influencia del polimorfismo más frecuente (la mutación Ala>Val en el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa) constituye un ejemplo de la interacción genética con el ambiente, ya que no es significativa en sujetos con folato o vitamina B12 por encima del percentil 50.

La homocisteína, puede desempeñar un papel en el desarrollo de lesiones periféricas asociadas a enfermedad cardiovascular. Los estudios sugieren que induce componentes inflamatorios así como contribuye al desarrollo de las placas arterioscleróticas, promueve la formación de trombos, potencia los efectos aterogénicos de la Lp(a), facilita la agregación de las plaquetas y provoca toxicidad directa e indirecta sobre la célula endotelial debido a estrés oxidativo por formación de radicales libres.

Los resultados de estudios de caso-control y de cohorte dejan entrever que la elevación leve de la homocisteína plasmática es factor de riesgo moderado, pero independiente para las complicaciones vasculares en la población sana y un factor pronóstico de mortalidad entre la población afecta de complicaciones macrovasculares (19). El aporte suplementario con finalidad de normalizar los niveles no disminuye el riesgo cardiovascular (20).

La elevación de la homocisteína, frecuente en personas con nefropatía, aumenta de manera proporcional al grado de disfunción renal y puede contribuir de manera importante al exceso de morbilidad y mortalidad observado en las personas con insuficiencia renal.

Dada la incertidumbre de los datos, las directrices del ACC/AHA y TASC-II no aconsejan determinar su concentración a menos que el paciente padezca nefropatía o presente enfermedad arterial periférica sin factores de riesgo discernibles.

2.7 Estrés Oxidativo. Inflamación.

Durante los últimos años hemos ido conociendo que la resistencia a la insulina y la DM2 están relacionadas con la activación del sistema inmunológico y la inflamación. La hiperglucemia junto a las alteraciones en las lipoproteínas participa en la inflamación al provocar productos finales de la glucosilación (AGE), estrés oxidativo intracelular (21) y estimular la secreción de reactantes de fase aguda por el tejido graso (11). Por sus características de bajo grado se define como metainflamación, inflamación metabólica, para diferenciarla de la inflamación aguda. Junto a la inflamación se ha mostrado mayor neoformación de la adventicia.

El sistema inmunológico reconoce, mediante receptores, componentes de agentes nocivos: los PAMP (pathogen associated molecular proteins). Estos receptores PRR (pathogen recognition receptors) identifican diversos PAMP como lípidos, lipopolisacáridos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos. Este reconocimiento activa la respuesta inflamatoria en un intento de eliminar el agente nocivo. En la respuesta participan los adipocitos y los macrófagos, genéticamente relacionados, ya que los preadipocitos pueden diferenciarse en macrófagos.

La enfermedad vascular sería un proceso inflamatorio de reacción a tres cuerpos extraños: la célula endotelial con su contenido que pasa al medio, una hemorragia intraarterial y el colesterol en sus diversas formas de transporte. La primera fase se centra en el daño endotelial debido a factores de riesgo cardiovasculares clásicos. Una vez que el endotelio está dañado entra en escena el colesterol LDL y el organismo intenta defenderse, pero los factores lesivos son más potentes e impiden la correcta regeneración. Todavía se desconocen totalmente los factores que dan lugar al proceso lesivo arterial; existen varias teorías como por ejemplo el estrés oxidativo. El proceso inflamatorio acaba claudicando entrando en una fase de apoptosis celular.

Moléculas que intervienen en la inflamación como el sistema NF- κ B, las interleucinas (IL-1, IL-6), el TNF- α y la PCR están relacionadas en estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales con la macroangiopatía en la DM2.

El factor de transcripción NF- κ B es un factor clave como regulador del balance de genes pro y antiinflamatorios, así como regulador de la proliferación celular. Induce la expresión de citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 entre otras), quimiocinas (MCP-1, IL-8), moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1...) y proteínas de fase aguda (TNF- α , PCR) que intervienen en el inicio y desarrollo de la arteriosclerosis (22). Además, NF- κ B, parece mediar en las primeras fases de respuesta al estrés oxidativo y la apoptosis.

En el organismo existe un equilibrio entre la producción y degradación de radicales libres. El moderado exceso de su producción frente a la de su degradación produce estrés oxidativo que origina daños celulares (daños en lípidos de membranas celulares, el ADN y las proteínas) así como, reacciones de oxidación de lipoproteínas, eliminación del NO circulante, etc. En la DM2 se asocia un incremento en la producción de radicales libres, al tiempo que se produce un agotamiento del sistema de defensa antioxidante de origen múltiple.

El estrés oxidativo y numerosos productos a los que da lugar, especialmente las ROS, se consideran mecanismos subyacentes de la inflamación, disfunción endotelial, dislipemia diabética y resistencia a la insulina; en consecuencia participa en el inicio, desarrollo y complicaciones crónicas de la DM2 (23).

Los principales agentes oxidantes implicados en la DM2 son los denominados ROS que se comportan como radicales libres y se relacionan con el control de la función endotelial. Entre los ROS destacan moléculas como el anión superóxido (O_2^-), el grupo hidroxilo (OH^\cdot),

óxido nítrico (NO) y radicales lipídicos. Tres sistemas enzimáticos destacan como productores de ROS en la pared vascular: XO (xantinoxidasa), NADH/NADPH oxidasa y NO sintasa (24).

Otros marcadores de estrés oxidativo son: los isoprostanos y el malondialdehído (MDA). El MDA es un cetoaldehído fisiológico producido por peroxidación en el metabolismo del araquidonato. El exceso de MDA, como resultado del daño tisular, puede combinarse con las proteínas alterando sus propiedades biológicas. Estas proteínas resultantes, inmunogénicas, generan autoanticuerpos que se asocian probablemente con la macroangiopatía (25). Los isoprostanos, moléculas semejantes a las prostanglandinas, reaccionan con los ácidos grasos insaturados, especialmente el araquidónico de las membranas celulares mediante radicales libres. Se han involucrado en la patogenia de la arteriosclerosis y son método fiable para determinar el estrés oxidativo in vivo (26).

El estrés oxidativo y la oxidación de diversas moléculas tienen como consecuencia una respuesta mediada por factores y moléculas que conllevan activación o represión de numerosos genes, como podrían ser:

- Enzimas que intervienen en la producción de óxido nítrico: eNOS, iNOS y nNOS.
- Sistemas implicados en el estrés oxidativo mediante producción: NADH oxidasa y XO; o eliminación de radicales libres: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y sistema glutatión (GSS, GSR y GPX).
- Sistemas que eliminan el resultado de la reacción entre radicales libres y moléculas de gran tamaño, previenen su oxidación o las eliminan: glutatión transferasas.
- Genes implicados en la transmisión de señales del estrés oxidativo o que lo inducen: angiotensina, endotelina y IGF-1 o 2 (insulin growth factor) y sus receptores.
- Genes implicados en el metabolismo energético que pueden inducir aumento o disminución de radicales libres.
- Factores de transcripción que pueden activar o reprimir la expresión de genes de respuesta al estrés oxidativo: NF- κ B, AP-1 y 2, Nrf-1 y 2, SP1BP, PPARs α , β y γ (polimorfismos de estos genes se han relacionado con enfermedad cardiovascular y sensibilidad a la insulina) y “CAAT-enhancer binding-protein” (C-EBP α , β , γ y ϵ).

Son numerosos los estudios observacionales que muestran los beneficios de la ingesta dietética de antioxidantes en la DM2, sin embargo la intervención con antioxidantes ha fracasado. En esta paradoja hay que tener en cuenta que los efectos de los antioxidantes tendrán reflejo cuando forman parte de un hábito y los síntomas de la enfermedad todavía no han aparecido.

2.8 Genética y epigenética de la diabetes tipo 2.

La contribución de los factores genéticos al desarrollo de la resistencia a la insulina, alteraciones en la secreción de insulina y DM2 se conoce desde la década de los cincuenta. Las evidencias que respaldan esta contribución son el agrupamiento familiar, la mayor concordancia en gemelos monocigotos y la elevada prevalencia en determinados grupos étnicos.

Descubrir las bases genético-moleculares de la DM2 es actualmente foco de atención. La búsqueda ha tenido éxito sobre todo en tipos especiales de diabetes que se transmiten con un patrón mendeliano, formas monogénicas. Aunque estos síndromes son menos frecuentes han permitido identificar genes candidatos y conocer mejor la etiología de las formas más comunes de DM2.

Los estudios de genes candidatos y diferentes análisis completos del genoma, realizados principalmente en familias o en grupos de casos-controles y en diferentes poblaciones, han permitido identificar centenas de regiones cromosómicas implicadas en la regulación de diferentes rutas metabólicas que potencialmente pueden estar asociadas con la obesidad, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. Por otro lado, numerosos estudios han tratado de asociar cambios genómicos con la presencia de complicaciones crónicas en la DM2 (27). Algunos genes se han relacionado con la retinopatía (VEFG), con la nefropatía (ELMO1 y otros) y con la cardiopatía isquémica (ADIPOQ) en la DM2 (28).

El proyecto internacional Hap-MAP proporciona un mapa nucleótido de una extensa variedad de poblaciones y representa una herramienta para estudios GWAS (genome wide association studies); pudiendo facilitar la identificación de asociaciones genéticas en la diabetes como enfermedad compleja. Con microarrays para polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) y mediante estudios de asociación de fenotipos con análisis de variantes del genoma, se han identificado algunas bases genéticas de la DM2. Es conocido que en la etiología están implicadas tanto la resistencia a la insulina como una insuficiente secreción, se han estudiado a fondo los genes que se saben participan en la acción de la insulina o en su producción. Así mismo, sabido el vínculo entre obesidad y la DM2 se han tenido en cuenta los genes implicados en la regulación del balance energético y en el tejido adiposo.

La epigenética o estudio de los cambios heredables en la expresión de genes en ausencia de cambios en la secuencia del ADN, puede explicar las diferencias heredables pero reversibles. Los factores epigenéticos incluyen metilación de ADN, modificación de histonas y microARN.

Se conoce que los cambios epigenéticos pueden ser inducidos por la edad. El proceso de envejecimiento influye en la metilación de ADN y en la expresión de genes. Estudios del genoma han identificado variantes genéticas que podrían explicar susceptibilidad a DM2 y alteraciones en las histonas de células endoteliales, musculares lisas y célula beta pancreática que tratan de explicar la adaptación y memoria celular en la interacción y retroalimentación del ambiente con nuestras bases genéticas (28-30).

El conocimiento genético y epigenético, si bien define los mecanismos implicados, debe situarse en la investigación. En el momento actual, en la DM2, la aportación de genes identificados apenas explica el 5% de la herencia. Los loci identificados por GWAS explican una fracción pequeña de las predisposiciones a DM2 y no conocemos la funcionalidad de muchos; pero ayudarán a explicar el desarrollo y gravedad de las complicaciones crónicas de la DM2 (30). No conocemos los fenómenos epigenéticos que regulando la expresión o represión de genes puedan relacionarse con el desarrollo de complicaciones crónicas de la enfermedad.



3. SINOPSIS

El hecho de padecer DM2 ejerce un efecto independiente y multiplicador en la incidencia de complicaciones vasculares, añadido a la presencia de factores de riesgo clásicos. Pero no todos los diabéticos desarrollan con la misma gravedad la VP, expresión de macroangiopatía precoz, extensa y grave de la DM2.

Por otro lado, el riesgo es ya elevado en los sujetos en fase de prediabetes, en donde las complicaciones vasculares pueden preceder a la aparición de la DM2. De hecho, la prevalencia de cardiopatía isquémica en DM2 recién diagnosticada puede ser igual que en la DM2 de años de evolución (7).

Estos datos hacen pensar en una causalidad múltiple en donde la arteriosclerosis y la diabetes comparten algunos genes y factores ambientales implicados en los mecanismos aterogénicos.

En este incremento de riesgo, la biología vascular pone de manifiesto la participación de otros factores aterogénicos, presumiblemente reversibles, como el estrés oxidativo y el estado crónico inflamatorio.

En la arteriosclerosis de la DM2 se ha demostrado una actividad inflamatoria crónica fibroproliferativa favorecida por el estrés oxidativo y fenómenos de glucosilación (AGE). Además, se produce disfunción endotelial primariamente por la propia hiperglucemia crónica, oxidación de la lipoproteína LDL, hiperinsulinemia y estrés oxidativo. El aumento de mortalidad en DM2 se asocia con factores inflamatorios (riesgo relativo 1,43) y con la disfunción endotelial (riesgo relativo 1,23) de forma que ambas explican el 43% de la mortalidad cardiovascular global. El mayor riesgo vascular, se relaciona por tanto, con el grado de disfunción endotelial y con la inflamación de bajo grado.

Los principales sistemas conocidos de estrés oxidativo a nivel endotelial relacionados con la arteriosclerosis son la xantinoxidasa (XO), NADPH oxidasa y óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) (23). Estos sistemas pro-oxidantes generan especies reactivas de oxígeno. Para compensar este exceso oxidante nuestro organismo utiliza sistemas antioxidantes; los principales son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el sistema glutatión (GSS, GSR, GPX) (24). El estrés oxidativo y numerosos productos a los que da lugar a nivel endotelial originan una serie de daños celulares: oxidación de lipoproteínas, alteración en el óxido nítrico; que se han relacionado con el inicio y desarrollo de la arteriosclerosis (21, 31). Estos enzimas pro y antioxidantes son codificados por genes, en los que han sido descritos numerosos polimorfismos (21, 31). En este trabajo de investigación nos centramos en estudiar el papel que juega el sistema glutatión en la VP.

Las complicaciones crónicas macrovasculares dependen, como sabemos, de la edad, tiempo de evolución de la enfermedad, del control metabólico de la glucemia y lípidos. Es básico conocer los factores, que junto a los clásicos, se asocian con la vasculopatía del diabético. Probablemente como hemos descrito, son la combinación de factores relacionados con la hiperglucemia crónica, inflamación y el estrés oxidativo junto a otros factores biológicos. Su

conocimiento facilita la prevención y tratamiento, y evita las elevadas consecuencias socio-sanitarias que supone la enfermedad macrovascular del DM2.

Esta necesidad de buscar nuevos factores: a) biológicos como el estrés oxidativo y b) polimorfismos genéticos asociados con la VP del diabético son el principal objetivo de nuestro trabajo de investigación.



4. HIPÓTESIS

Con las premisas antes comentadas nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

En los pacientes diabéticos tipo 2 debe existir un incremento de marcadores de estrés oxidativo (homocisteína y sistema glutatión) relacionados con la vasculopatía periférica. En este sentido, es probable que determinados polimorfismos de genes que regulan estos marcadores se asocien con la presencia de vasculopatía periférica.



5. OBJETIVOS

Objetivo primario:

Estudiar y analizar la asociación de marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes con la vasculopatía diabética periférica.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la relación de marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes (homocisteína, malonildialdehído y sistema glutatión) con la presencia y grado de vasculopatía periférica en sujetos con diabetes tipo 2.
2. Conocer y analizar cómo diferentes polimorfismos relacionados con el estrés oxidativo se asocian con la presencia y grado de vasculopatía periférica.
3. Establecer marcadores biológicos de riesgo para vasculopatía periférica en el paciente con diabetes tipo 2.

A photograph of laboratory glassware. In the foreground, a conical flask contains a yellow liquid. To its right is a rack holding several test tubes with colored caps (blue, orange, purple). In the background, a large flask pours a brown liquid into a tray of more test tubes. The scene is brightly lit with a soft blue background.

6. METODOLOGÍA

6.1 Sujetos

Se incluyen 204 pacientes diabéticos tipo 2, que acuden a la Consulta de Endocrinología del Hospital Clínico de Valencia o de Medicina Interna del Centro de Especialidades del Hospital de Ontinyent en el periodo comprendido entre enero de 2009 a mayo de 2010. El protocolo del estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia. La selección de la muestra es consecutiva.

Todos los pacientes reciben información suficiente sobre el estudio y solo participan aquellos que otorgan su consentimiento.

Criterios de inclusión

1. Diabetes tipo 2.
2. Sujetos no amputados o con amputación unilateral.
3. Edad mayor o igual a 40 años.
4. Hombre o mujer.

Criterios de exclusión

1. Diabetes tipo 1.
2. Amputación bilateral.
3. Edad menor de 40 años.
4. Enfermedades avanzadas que modifican cualquiera de los factores de estudio: EPOC, insuficiencia cardiaca NYHA>II, cirrosis hepática y enfermedad neoplásica.
5. Artropatía de Charcot.
6. Índice tobillo-brazo > 1,20.

6.2 Diseño

Estudio observacional transversal de caso/control. Se considera casos a los diabéticos con vasculopatía periférica, definida por un índice de ITB menor de 0,9, como expresión de macroangiopatía diabética que afecta a los distintos territorios arteriales. Se consideran controles a los diabéticos con ITB entre 0,9 y 1,20.

6.3 Método

Todos los datos son recopilados por un solo investigador. A cada uno de los pacientes se le aplica el protocolo de investigación que describimos a continuación, haciendo uso de los medios e infraestructuras del Hospital Clínico de Valencia.

6.3.1 Entrevista Clínica

Mediante entrevista se recogen los siguientes parámetros: edad, sexo, hábito

tabáquico y, en su caso, años de exfumador, consumo de alcohol, ejercicio físico semanal, tiempo de evolución de la diabetes conocida por el paciente, grado de educación diabetológica, tratamiento para hipertensión o dislipemia, complicaciones cardiovasculares tales como: infarto agudo de miocardio definido como elevación transitoria de las CK-MB o de las troponinas, en un paciente que asocie al menos una de las siguientes condiciones: dolor precordial típico, signos electrocardiográficos como aparición de onda Q patológica o desnivel del segmento ST, infarto isquémico cerebral definido como sintomatología de focalidad neurológica que no se resuelve en 24 horas y tomografía computarizada craneal normal o con imagen hipodensa.

6.3.2 Exploración clínica

El estudio antropométrico se realiza a todos los pacientes en condiciones iguales y por el mismo investigador.

Talla y peso: Se obtienen utilizando balanza y estadiómetro estandarizados y bien calibrados. El peso se determina con el paciente descalzo y vistiendo ropa ligera. La medición se realiza en kilogramos con una precisión de $\pm 100g$. La talla se mide con el sujeto descalzo, en bipedestación y con la cabeza situada en el plano de Frankfurt (plano horizontal nariz-trago), expresada en centímetros con una precisión $\pm 0,5cm$.

Índice de masa corporal (IMC): Peso en kilogramos partido por la altura en metros al cuadrado (Kg/m^2).

Perímetro de la cintura: Para su medición se usa cinta métrica flexible y milimetrada; se fija un punto medio entre la última costilla y la parte superior de la cresta ilíaca, rodeando la cintura y estando el paciente en espiración con el abdomen relajado, según consenso de la SEEDO 2007.

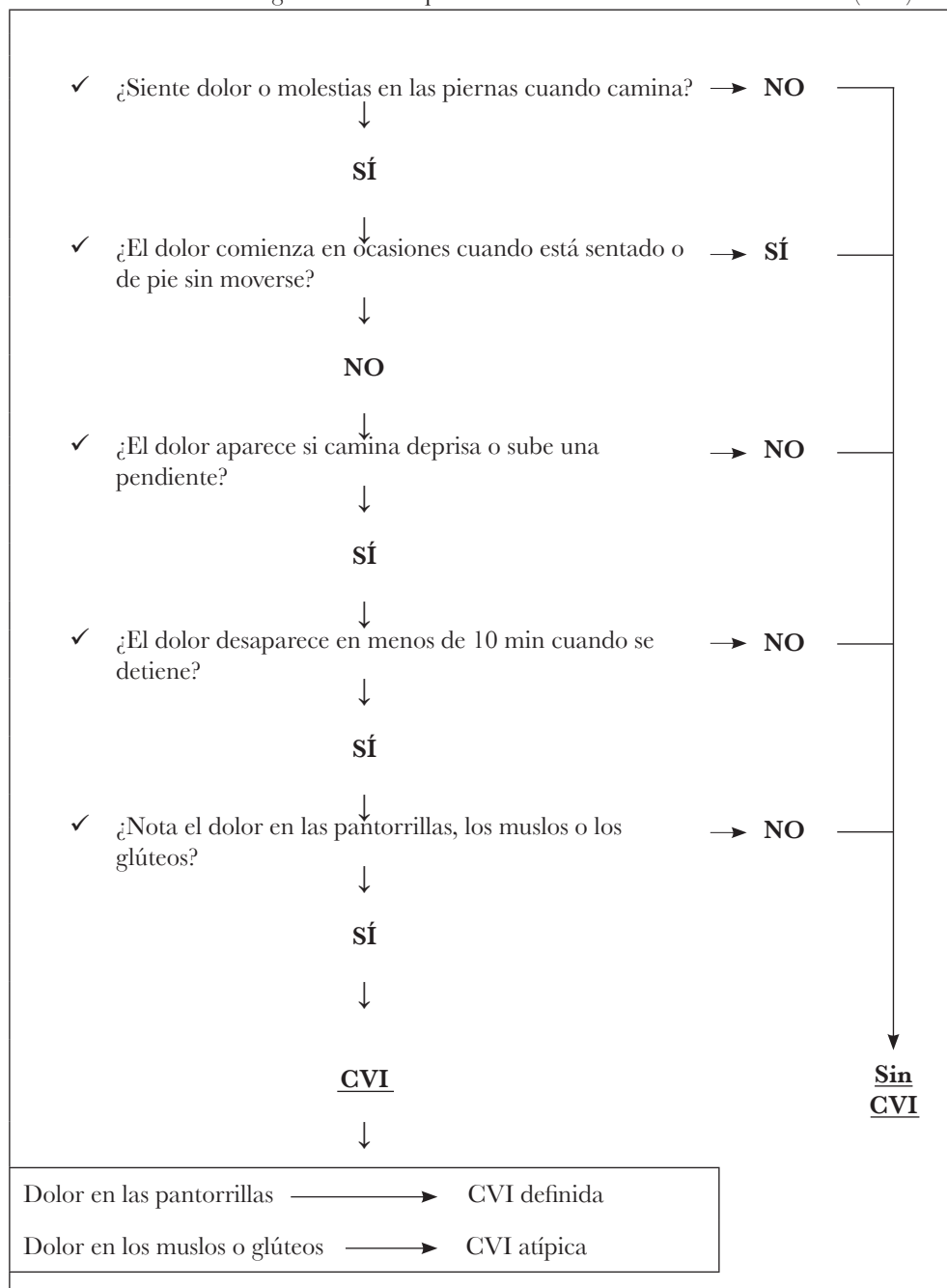
Presión arterial: Se mide después de cinco minutos en reposo y el paciente sentado en una silla con su espalda apoyada y brazos a nivel del corazón, sin haber fumado o ingerido caféina durante los 30 minutos previos. Se usa esfigmomanómetro de mercurio y brazaletes para ocupar el 80% de la longitud del brazo. Se anota el promedio de dos o más mediciones tomadas de forma separada, desestimando la primera y con un intervalo de dos minutos. Si las dos primeras mediciones difieren por más de 5 mmHg se obtiene mediciones adicionales, siguiendo las condiciones de medición del grupo de trabajo de la Sociedad Europea de Hipertensión.

Retinopatía: los pacientes se remiten al servicio de oftalmología del Hospital Clínico para determinar la presencia de retinopatía y en caso afirmativo diferenciar si es o no proliferativa.

Vasculopatía: La vasculopatía se valora por:

1. Presencia de claudicación intermitente medida por el Cuestionario de Edimburgo modificado para claudicación intermitente vascular (sensibilidad y especificidad en población de riesgo moderado-alto es de 14-31% y de 93-96%).

Cuestionario de Edimburgo modificado para Claudicación Intermitente Vascular (CIV)



2. Determinación del índice tobillo-brazo (ITB), mediante esfigmomanómetro de mercurio y doppler bi-direccional Smartdrop™ 20, tras 5-10 minutos de reposo y con una temperatura ambiental agradable. Mediante el transductor se busca el punto en el que se oye mejor el latido

arterial y se deshincha lentamente el manguito (2mmHg/seg); considerando la aparición del primer ruido como el valor de presión arterial sistólica a ese nivel. Se utiliza como numerador la presión arterial más alta en el miembro inferior y como denominador la presión arterial más elevada en el brazo. La medida se realiza en: las arterias tibial posterior y pedia de ambas piernas; y así mismo, en los dos brazos tomando en este caso solo el valor mayor obtenido.

El grado de neuropatía: se establece por criterios clínicos y exploratorios mediante los índices NSS y NDS respectivamente.

Neuropathy Symtom Score (NSS): donde cada síntoma tiene una valoración y la puntuación máxima es de 9 puntos como se muestra en el siguiente cuadro sinóptico.

Índice de Síntomas Neuropáticos (NSS).

Cansancio, calambre o dolor: 1 punto.
Quemazón, adormecimiento u hormigueo: 2 puntos.
Si los síntomas anteriores en los pies: +2 puntos. Sí solo en pantorrillas: +1 punto.
Si se agravan solo por la noche: +2 puntos. Sí durante el día y la noche: +1 punto.
Si mejoran con caminar (+2 puntos) con bipedestación (+1 punto).
Grado de polineuropatía según el índice: leve 3-4, moderada 5-6 y grave 7-9 puntos.

Neurological Disability Score (NDS): La sensibilidad dolorosa se explora pinchando con punta de acero roma para evitar lesiones. Para la sensibilidad vibratoria utilizamos un diapasón de 64Hz – 128c Ryder-Seiffer. La sensibilidad térmica se mide con la diferencia entre frío y calor. Y los reflejos aquíleos se valoran con un martillo de reflejos convencional.

Índice de Signos Neuropáticos. (NDS).

	Derecha		Izquierda			
	Normal	Anormal	Normal	Anormal		
Sensibilidad*						
Dolorosa (aguja)	0	1	0	1		
Vibratoria (128 Hz)	0	1	0	1		
Temperatura (frío metal)	0	1	0	1		
Reflejos aquileos: Presentes	Con maniobra de refuerzo	Ausentes	Presentes	Con maniobra de refuerzo	Ausentes	
	0	1	2	0	1	2
Grado de polineuropatía según el “NDS”: 3-5 leve, 6-8 moderada, 8-10 grave. *La sensibilidad se explora sobre el dorso de la primera articulación.						

6.3.3 Parámetros bioquímicos

Las muestras de sangre se extraen con ayuno mínimo de diez horas en la Unidad de Pruebas Funcionales del Hospital Clínico Universitario. Se utilizan métodos estandarizados: EN SANGRE

- Recuento y fórmula leucocitaria, hemoglobina, hematocrito y plaquetas mediante autoanalizador.
- Fibrinógeno por reacción antígeno-anticuerpo.
- Glucosa utilizando el método enzimático colorimétrico de la glucosa oxidasa.
- HbA1c mediante el método HPLC (Cromatografía Líquida de alta Eficacia).
- Creatinina por método fotolorimétrico mediante reacción ácido pícrico.
- Urea realizando prueba UV cinética AA.
- Filtrado glomerular estimado por fórmula de MDRD (Modification of Diet in Renal Disease).
- Colesterol total calculado mediante método enzimático fotolorimétrico de precipitación con ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio.
- Triglicéridos utilizando método fotolorimétrico mediante la determinación del glicerol contenido en las moléculas de TG tras su hidrólisis mediante lipasas.
- Colesterol-HDL (cHDL) mediante precipitación con polianiones con ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio.
- Colesterol LDL (cLDL) se usó la fórmula de Friedewald: Colesterol total - [(triglicéridos/5) + cHDL].
- Colesterol VLDL (cVLDL) realizando centrifugación en gradiente 1006.

- Apo A y B por inmunoturbidimetría.
- ApoB-VLDL y Lp(a) mediante nefelometría.
- Homocisteína, ácido fólico y Vitamina B12 utilizando ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).
- Ácido úrico por método enzimático fotocolorimétrico. Uricaza, reacción de Trinder.
- Transferrina con inmunoturbidimetría.
- Albumina con fotocolorimetría, reacción verde bromocresol.

EN ORINA

Creatinuria y albuminuria por inmunoturbidimetría para el cálculo de índice albúmina/creatinina y medición de la microalbuminuria.

6.3.4 Estudio Genético: estrés oxidativo

Se realiza extracción de ADN de linfo-monocitos por procedimiento estandarizado y se procede al almacenaje en genoteca para estudio de polimorfismos de xantinaoxidasa y homocisteína.

La sangre se recoge en tubos heparinizados y se conserva en frío (4°C) para su inmediato procesamiento que varía según el análisis a realizar. La determinación de la actividad antioxidante total del plasma se lleva a cabo mediante Kits comerciales de la casa Randox según protocolo.

Los valores GSSG y GSH (Disulfuro de glutatión y Glutatión) se determina mediante cromatografía de alta presión (HPLC) y detección UV, haciendo uso de patrones apropiados y siguiendo la metodología descrita previamente (32).

6.4 Métodos estadísticos

Se considera estadísticamente significativa una probabilidad menor al 5%. El tamaño de la muestra se calcula teniendo en cuenta un error alpha inferior al 5% y un error beta inferior al 20%, para un riesgo atribuible (odds ratio) > 2.

Para las variables continuas se calcula la media y la desviación estándar (DE). Las medias de las variables cuantitativas se han comparado entre grupos con la prueba t de Student para los datos no apareados. Para la Lp(a) utilizamos también su logaritmo, puesto que no sigue una distribución normal. La comparación de las variables cualitativas entre grupos se realiza con el test de χ^2 .

Para estudiar las asociaciones se ha utilizado la prueba de regresión simple.



7. RESULTADOS

La población inicial es de 204 individuos, de los cuales cuatro sujetos quedan excluidos por no firmar el consentimiento informado; dos por diagnóstico durante el estudio de otros tipos específicos de diabetes y otros dos que aunque acuden a la consulta inicial no finalizan el estudio por no presentarse a la analítica. Del total resultante, 196 sujetos, se excluyen finalmente treinta y uno de ellos por presentar ITB > 1,20. Finalmente, queda una población de 165 diabéticos, 81 mujeres y 84 hombres.

7.1 Marcadores biológicos de riesgo.

Las características generales de la población global quedan detalladas en la **Tabla 1**. Destacamos un control metabólico no satisfactorio con un tiempo de evolución de la diabetes conocido por el sujeto superior a diez años; la tensión arterial sistólica superior a la media de los parámetros estándares; la mayoría de ellos presentan criterio de obesidad (IMC de 30,34 kg/cm²) y un perímetro de la cintura medio de 103,69 cm. Así mismo, la desviación estándar de los valores de creatinina y la albuminuria de 108,65 mg/24h representan criterios de enfermedad renal crónica. Por último, destacamos la hemoglobina glucosilada de 7,74%, el cHDL de 46,45 mg/dl y cLDL 128,52 mg/dl.

Tabla 1. Características generales del grupo.

n=165	Media \pm desviación estándar
Edad (años)	67,54 \pm 10,60
Tiempo de evolución (años)	13,67 \pm 9,63
Tensión sistólica (mmHg)	158,86 \pm 21,41
Tensión diastólica (mmHg)	84,26 \pm 11,57
IMC (kg/cm ²)	30,34 \pm 5,66
Perímetro de la cintura (cm)	103,69 \pm 11,84
ITB	1,01 \pm 0,29
Glucosa (mg/dl)	161,27 \pm 54,27
Úrea (mg/dl)	44,06 \pm 24,15
Creatinina (mg/dl)	1,08 \pm 0,83
Ácido úrico (mg/dl)	5,25 \pm 3,36
Colesterol Total (mg/dl)	197,43 \pm 47,81
Triglicéridos (mg/dl)	145,65 \pm 96,15
HDLc (mg/dl)	46,45 \pm 13,91
LDLc (mg/dl)	128,52 \pm 43,04
ApoA (mg/dl)	140,25 \pm 35,14
Log Lp(a)	1,25 \pm 0,52
HbA1c (%)	7,74 \pm 1,63
Homocisteína (μ mol/l)	12,26 \pm 4,8
Albuminuria 24h (mg/l)	108,65 \pm 212,5
Fibrinógeno (mg/dl)	4,25 \pm 1,32

La vasculopatía periférica definida por el ITB, motivo de nuestro estudio, define los grupos caso/control. Con tal motivo se considera un valor de ITB < 0,9 como parámetro definitorio de vasculopatía periférica y se descarta los pacientes con ITB > 1,20 por no comprensible debido a la posible calcificación de la pared arterial.

Aplicando estos parámetros resulta un grupo de 108 pacientes con vasculopatía periférica (ITB<0,9) y otro de 57 pacientes sin vasculopatía periférica (ITB 0,9-1,20).

En la **Tabla 2** mostramos las medias del ITB de ambos miembros y el ITB menor seleccionado en cada caso. Como era de esperar estadísticamente significativas. Destacamos en rojo los valores significativos tanto en esta tabla como en las sucesivas.

Tabla 2. Medias de ITB.

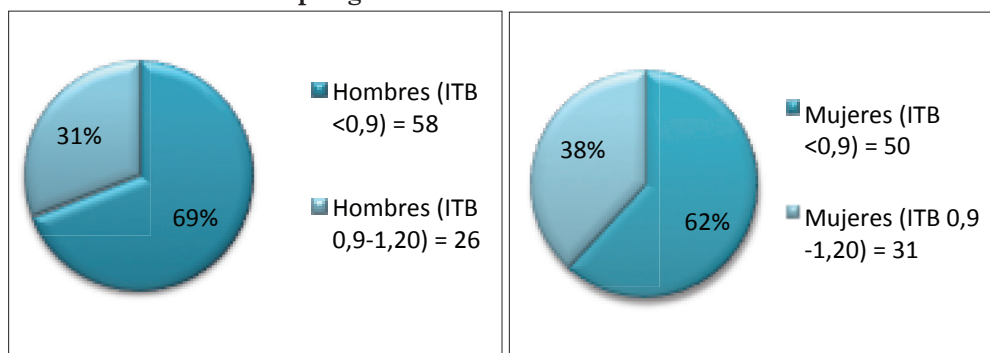
n=165	ITB <0,9 (n= 108)	ITB 0,9 - 1,2 (n=57)
ITB MENOR	0,81 ± 0,20	1,01 ± 0,18
ITB	0,85 ± 0,19	1,13 ± 0,18

ITB: p < 0,001

Una vez establecidos los dos grupos caso/control detallamos los resultados obtenidos de los factores de riesgo estudiados.

La distribución por géneros no muestra hallazgos significativos, como se observa en la **Gráfica 1**.

Gráfica 1. Distribución por géneros.



No significativo

En la **Tabla 3**, que muestra parámetros habituales relacionados con la enfermedad cardiovascular, observamos la similitud entre las dos poblaciones probablemente debido a que se trata de pacientes seguidos en la misma unidad de referencia. Solo la edad muestra una discreta significación esperable, dada la evolución crónica de la enfermedad arteriosclerótica en el diabético.

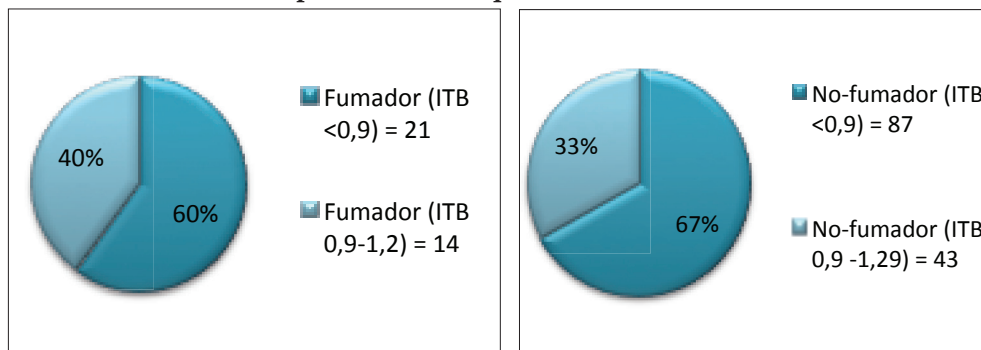
Tabla 3. Parámetros clínicos.

n=165	ITB <0,9 (n= 108)	ITB 0,9 - 1,2 (n=57)
Edad (años)	68,96 ± 10,03	64,53 ± 11,39
Tiempo (años)	12,44 ± 9,18	13,46 ± 8,65
Tensión sistólica (mmHg)	160,42 ± 20,48	155,89 ± 20,80
Tensión diastólica (mmHg)	84,72 ± 10,42	84,20 ± 13,27
Perímetro de la cintura (cm)	103,31 ± 11,60	104,11 ± 12,38
Urea (mg/dl)	44,10 ± 18,81	44,79 ± 35,28
Creatinina (mg/dl)	1,03 ± 0,41	1,25 ± 1,41
Ácido Úrico (mg/dl)	5,11 ± 1,74	5,60 ± 5,68
IMC (kg/cm ²)	30,14 ± 5,78	30,95 ± 6,02

Edad: p < 0,01

El hábito tabáquico no es un factor diferenciador entre las dos poblaciones como se muestra en la **Gráfica 2**. Se considera fumadore a aquellos pacientes que comunican su hábito independientemente del tiempo o cantidad y no-fumador a aquellos no fumadores con al menos un mes de antigüedad.

Gráfica 2. Distribución por hábito tabáquico.



No significativo

En la **Tabla 4** mostramos la prevalencia de hipertensión. Destaca un 57% de pacientes con hipertensión, aunque sus valores no son significativos en la comparativa por ITB.

Tabla 4. Prevalencia de HTA.

	ITB <0,9 (n= 108)	ITB 0,9 - 1,2 (n=57)	n= 165
Sin HTA	44 (40,7%)	27 (47,4%)	71 (43%)
Con HTA	64 (59,3%)	30 (52,6%)	94 (57%)

No significativo

En las **Tablas 5, 6 y 7** se muestran los resultados obtenidos en relación al metabolismo lipídico, en ellas se refiere la diferencia significativa de la prevalencia y el tratamiento. En la **Tabla 5**, el cociente de predicción de enfermedad cardiovascular cLDL/cHDL, muestra una diferencia estadísticamente significativa, siendo éste de riesgo medio en la población con vasculopatía periférica. En la **Tabla 7** se observa que aproximadamente el 40% de la población con ITB<0,9 presenta tratamiento para la dislipemia.

Tabla 5. Perfil lipídico.

n= 165	ITB < 0,9	ITB 0,9 - 1,2
Colesterol (mg/dl)	199,30 ± 47,45	193,93 ± 38,76
Triglicéridos (mg/dl)	145,13 ± 88,86	140,64 ± 97,75
cHDL (mg/dl)	45,98 ± 15,85	47,93 ± 11,20
cLDL/cHDL	3,09 ± 1,25	2,59 ± 0,73
ApoA(mg/dl)	140,68 ± 35,42	143,74 ± 32,24
cVLDL (mg/dl)	43,95 ± 37,24	41,15 ± 31,49
cVLDL/Triglicéridos	0,30 ± 0,17	0,30 ± 0,16
TgVLDL (mg/dl)	133,83 ± 137,01	114,85 ± 85,38
ApoBVLDL (mg/dl)	23,15 ± 33,35	18,06 ± 16,70

cLDL/cHDL: p < 0,01

Tabla 6. Prevalencia de dislipemia.

	ITB <0,9 (n= 107)	ITB 0,9 - 1,2 (n= 56)	n= 163
Sin dislipemia	63 (58,9%)	41 (73,2%)	104 (63,8%)
Con dislipemia	44 (41,1%)	15 (26,8%)	59 (36,2%)

Con dislipemia p=0,05

Tabla 7. Tratamiento para la dislipemia.

	ITB <0,9 (n= 108)	ITB 0,9 - 1,2 (n=56)	n= 164
Sin tratamiento	64 (59,3%)	43 (76,8%)	107 (65,2%)
Con tratamiento	44 (40,7%)	13 (23,2%)	57 (34,8%)

Con tratamiento: p<0,05

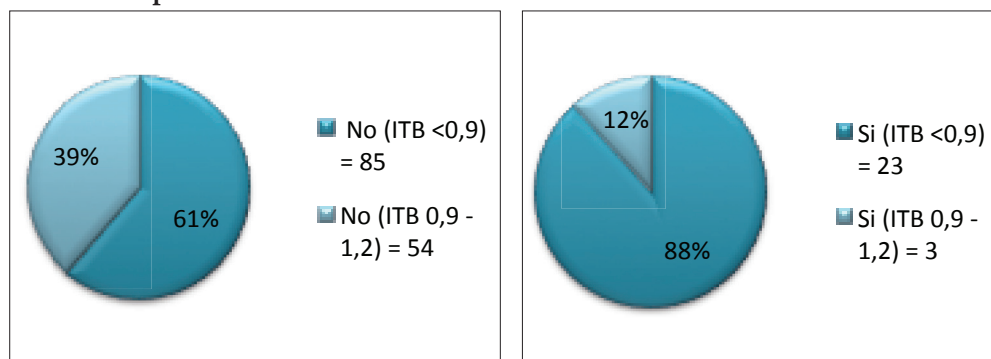
En el último grupo de parámetros bioquímicos obtenidos, que muestra la **Tabla 8**, muestra como significativos el logaritmo de Lp(a), el fibrinógeno y la homocisteína, con mayor relevancia estadística de este último parámetro. Son semejantes la hemoglobina glucosilada, el grado de albuminuria, el ácido fólico y la vitamina B12.

Tabla 8. Parámetros bioquímicos en diabéticos relacionados con VP.

n= 165	ITB < 0,9	ITB 0,9 - 1,2
HbA1c (%)	7,80 ± 1,66	7,59 ± 1,65
Log Lp(a)	1,32 ± 0,50	1,14 ± 0,54
Homocisteína (μmol/l)	13,08 ± 4,90	10,87 ± 4,10
Ácido fólico (ng/ml)	11,81 ± 5,43	11,31 ± 5,39
Vitamina B12 (pg/ml)	597,14 ± 412,72	461,62 ± 224,66
Albuminuria 24h (mg/l)	95,32 ± 189,87	109,09 ± 204,12
Fibrinógeno (mg/l)	4,43 ± 1,55	3,98 ± 1,03

Homocisteína: $p < 0,01$. Log Lp(a) y Fibrinógeno: $p < 0,05$

No sorprende la significativa diferencia en el número de episodios cardiovasculares, como muestra la **Gráfica 3**.

Gráfica 3. Episodios cardiovasculares.

Episodios cardiovasculares: $p < 0,01$

Se realiza un estudio de retinopatía por el servicio de oftalmología. Por parte del investigador se estudia la vasculopatía y la polineuropatía presentes en cada paciente mediante el Cuestionario de Edimburgo modificado para Claudicación Intermitente Vascular y la presencia de signos y síntomas neuropáticos (NDS, NSS). En las **tablas 9, 10 y 11** se pueden ver los resultados, siendo solo significativos en el caso de la vasculopatía.

Según los resultados del Cuestionario de Edimburgo se deduce una sensibilidad del 32% y una especificidad del 84% siendo la especificidad ligeramente inferior a la media conocida y la sensibilidad dentro de la media. Y para una prevalencia entre el 5-8% los valores de VPP (Valor Predictivo Positivo) son del 80% y VPN (Valor Predictivo Negativo) del 40%.

Tabla 9. Prevalencia de retinopatía.

	ITB <0,9 (n= 92)	ITB 0,9 - 1,2 (n=49)	n= 141
Sin retinopatía	51 (55,4%)	31 (63,3%)	82 (58,2%)
Con retinopatía no proliferativa	41 (44,6%)	17 (34,7%)	58 (41,1%)
Con retinopatía proliferativa	0 (0%)	1 (2%)	1 (7%)

No significativo

Tabla 10. Prevalencia de vasculopatía.

	ITB <0,9 (n= 108)	ITB 0,9 - 1,2 (n=57)	n= 165
Sin vasculopatía	73 (67,6%)	48 (84,2%)	121 (73,3%)
Con vasculopatía	35 (32,4%)	9 (15,8%)	44 (26,7%)

Con vasculopatía: $p < 0,05$

Tabla 11. Prevalencia de polineuropatía.

Neurological disability score	ITB <0,9 (n= 108)	ITB 0,9 - 1,2 (n=57)	n= 165
0-2	8 (7,4%)	3 (5,3%)	11 (6,7%)
3-5	29 (26,9%)	20 (35,1%)	49 (29,7%)
6-7	26 (24,1%)	16 (28,1%)	42 (25,5%)
8-10	45 (41,7%)	18 (31,6%)	63 (38,2%)

No significativo

No se atribuyen diferencias entre grupos según el tratamiento con insulina o con antidiabéticos orales. **Tablas 12 y 13.**

Tabla 12. Tratamiento con antidiabéticos orales.

	ITB <0,9 (n= 108)	ITB 0,9 - 1,2 (n=57)	n= 165
Sin ADO	48 (44,4%)	27 (47,4%)	75 (45,5%)
Con ADO	60 (56,6%)	30 (52,6%)	90 (54,5%)

No significativo

Tabla 13. Tratamiento con insulina.

	ITB <0,9 (n= 108)	ITB 0,9 - 1,2 (n=57)	n= 165
Sin insulina	47 (43,5%)	26 (45,6%)	73 (44,2%)
Con insulina	61 (56,5%)	31 (54,4%)	92 (55,8%)

No significativo

7.2 Polimorfismos relacionados con estrés oxidativo.

El recuento de polimorfismos genéticos relacionados con el estrés oxidativo: Xantinoxidasa (xo-337A>G, xo-565+64T>C y xo-1936A>G) y Homocisteína (MTHFR 1298, MTHFR 677 y CBS 1080) queda detallado en las **tablas 14 a 19**. En estos recuentos no destaca ningún hallazgo significativo.

Tabla14. Recuento polimorfismos genéticos. Xantinoxidasa xo-337A>G.

n=165	ITB < 0,9	ITB 0,9 – 1,2	Total
xo-337A>G	26	13	39
A/A	19	13	32
A/G	43	17	60
G/G	20	14	34

No significativo

Tabla15. Recuento polimorfismos genéticos. Xantinoxidasa xo-565+64T>C

n=165	ITB < 0,9	ITB 0,9 – 1,2	Total
xo-565+64T>C	12	9	21
C/C	34	17	51
C/T	46	20	66
T/T	16	11	27

No significativo

Tabla 16. Recuento polimorfismos genéticos. Xantinoxidasa xo-1936A>G

n=165	ITB < 0,9	ITB 0,9 – 1,2	Total
xo-1936A>G	9	9	18
C/C	57	36	91
C/T	36	12	48
T/T	6	2	8

No significativo

Tabla 17. Recuento polimorfismos genéticos. Homocisteína MTHFR 1298

n=165	ITB < 0,9	ITB 0,9 – 1,2	Total
MTHFR 1298	13	9	22
A/A	48	26	74
A/C	36	18	54
C/C	11	4	15

No significativo

Tabla 18. Recuento polimorfismos genéticos. Homocisteína MTHFR 677

n=165	ITB < 0,9	ITB 0,9 – 1,2	Total
MTHFR 677	16	9	25
C/C	40	21	61
T/C	33	19	52
T/T	19	8	27

No significativo

Tabla 19. Recuento polimorfismos genéticos. Homocisteína CBS 1080

n=165	ITB < 0,9	ITB 0,9 – 1,2	Total
CBS 1080	12	9	21
A/A	27	14	41
A/G	57	25	82
G/G	12	9	21

No significativo

7.3 Marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes.

Para el estudio del estrés oxidativo y por motivos de costes se selecciona de forma aleatoria 70 pacientes diabéticos tipo 2 de la cohorte total, cuya descripción muestra la **Tabla 21**. Previamente en la **tabla 20** hacemos referencia a los valores de referencia de nuestro laboratorio. Cabe destacar el riesgo cardiovascular global del grupo, reflejo esperado de la cohorte total.

Tabla 20. Valores de referencia

	Valores normales de laboratorio
GSH (nmol/ml)	22,1 ± 3,48
GSSG (nmol/ml)	0,24 ± 0,11
MDA (nmol/ml)	0,19 ± 0,07

Tabla 21. Características descriptivas del subgrupo

n=70	Media \pm desviación estándar
GSH (nmol/ml)	19,67 \pm 4,39
GSSG (nmol/ml)	3,43 \pm 0,35
MDA (nmol/ml)	1,82 \pm 0,19
Edad (años)	63,9 \pm 11,14
Tiempo evolución (años)	11,84 \pm 10,34
Tensión sistólica (mmHg)	149,51 \pm 19,36
Tensión diastólica (mmHg)	83,37 \pm 12,63
IMC (kg/m ²)	31,33 \pm 5,39
Perímetro de la cintura (cm)	107,95 \pm 11,46
ITB	0,87 \pm 0,17
Glucosa (mg/dl)	162,49 \pm 49,91
Creatinina (mg/dl)	0,96 \pm 0,37
Colesterol Total (mg/dl)	190,04 \pm 41,36
Triglicéridos (mg/dl)	151,04 \pm 80,28
HDLc (mg/dl)	48,26 \pm 11,56
HbA1c (%)	7,70 \pm 1,58
Albúmina (g/dl)	4,26 \pm 0,31
Albuminuria 24h (mg/l)	82,50 \pm 77,08
MDRD (mg/min/1,73 m ²)	101,19 \pm 49,17

Con el fin de conocer la participación del estrés oxidativo se separan dos grupos de 35 sujetos en función de su ITB. Se considera nuevamente un valor de ITB < 0,9 como parámetro definitorio de vasculopatía periférica. El descriptivo para t-Student de los datos no apareados se refleja en la **Tabla 22**, solo el ITB es estadísticamente significativo, que seguimos destacando en rojo.

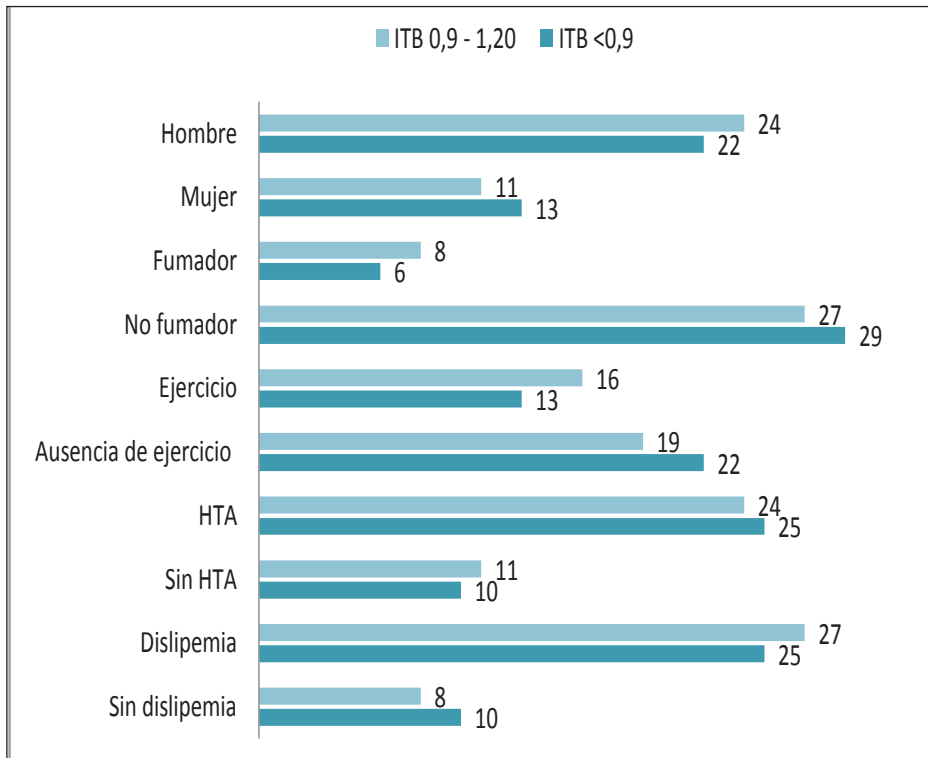
Tabla 22. Tabla comparativa por ITB

n=70	ITB <0,9 (n= 35)	ITB 0,9-1,2 (n=35)
GSH (nmol/ml)	19,50 ± 3,94	19,83 ± 4,84
GSSG (nmol/ml)	3,38 ± 2,93	3,48 ± 0,40
MDA (nmol/ml)	1,80 ± 0,16	1,85 ± 0,21
Edad (años)	64,66 ± 10,07	63,14 ± 12,22
Tiempo evolución (años)	11,99 ± 11,25	11,69 ± 9,50
Tensión sistólica (mmHg)	153,71 ± 18,44	145,31 ± 19,62
Tensión diastólica (mmHg)	82,71 ± 10,78	84,03 ± 14,37
IMC (kg/m ²)	31,50 ± 5,56	31,15 ± 5,27
Perímetro de la cintura (cm)	108,13 ± 10,01	107,77 ± 12,90
ITB	0,71 ± 0,09	1,02 ± 0,03
Glucosa (mg/dl)	156,29 ± 46,89	168,51 ± 52,65
Creatinina (mg/dl)	1,00 ± 0,43	0,93 ± 0,31
Colesterol Total (mg/dl)	190,32 ± 40,48	189,77 ± 42,79
Triglicéridos (mg/dl)	140,62 ± 74,59	161,17 ± 85,29
HDLc (mg/dl)	48,06 ± 10,42	48,46 ± 12,73
HbA1c (%)	7,57 ± 1,51	7,81 ± 1,65
MDRD (mg/min/1,73 m ²)	99,33 ± 54,79	103,00 ± 43,76

ITB: p<0,001

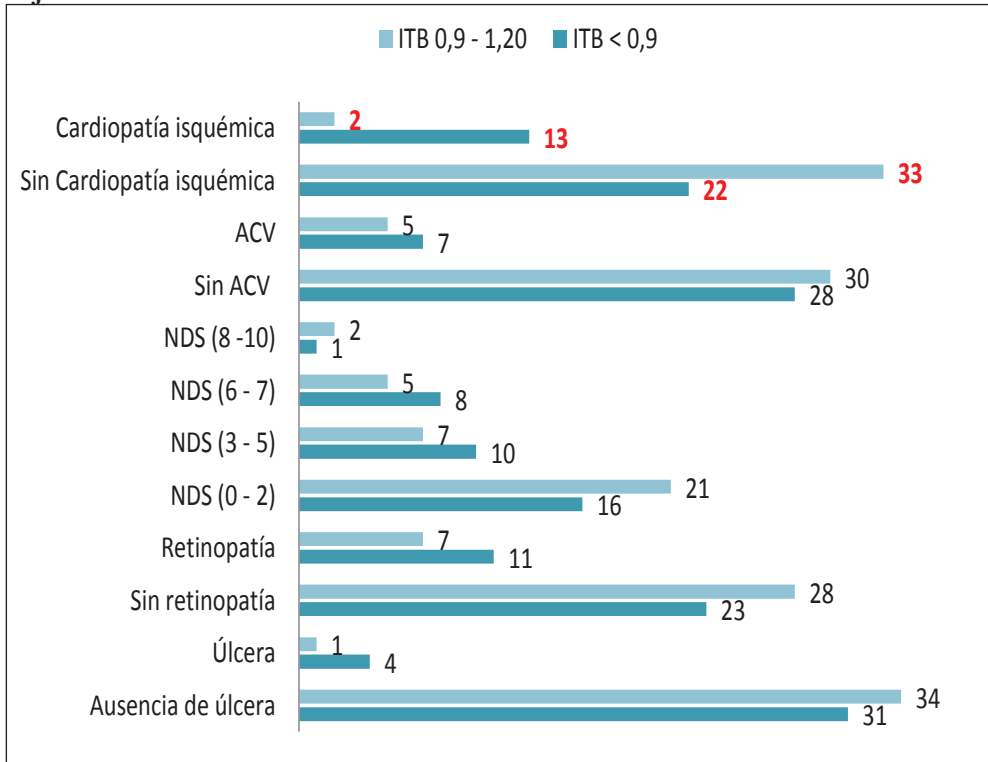
Las **tablas 23 y 24** muestran las diferencias en los parámetros cualitativos estudiados entre los dos grupos ya definidos previamente. La diferencia estadísticamente significativa solo se observa en la prevalencia de la cardiopatía isquémica (**ver tabla 24**).

Tabla 23. Distribución del género y factores de riesgo cardiovascular en los sujetos estudiados. Parámetros cualitativos I



No significativo

Tabla 24. Prevalencia de complicaciones micro- y macroangiopáticas en los sujetos estudiados. Parámetros cualitativos II



Cardiopatía isquémica: p=0,001

En la **tablas 25 a 28** se muestran los coeficientes de correlación de Pearson entre oxidación, medida por GSH, GSSG, MDA y las variables triglicéridos, homocisteína, colesterol total, edad y tiempo de evolución de la diabetes.

Tabla 25. Análisis de correlación de GSH

	Triglicéridos	Homocisteína
GSH	- 0,251 (p=0,03)	0,271 (p=0,026)

Tabla 26. Análisis correlación de GSSG

	Triglicéridos	MDA	Colesterol Total
GSSG	0,222 (p=0,05)	1 (p<0,0001)	0,204 (p=0,08)

Tabla 27. Análisis correlación de MDA

	Triglicéridos	GSSG	Colesterol Total
MDA	0,222 (p=0,05)	1 (p<0,0001)	0,204 (p=0,08)

Tabla 28. Análisis correlación de homocisteína

	Edad	GSH	Tiempo de evolución
Homocisteína	0,401 (p=0,001)	0,271 (p=0,026)	0,233 (p=0,05)

De los resultados expuestos se deduce que no existen diferencias significativas en los marcadores de estrés oxidativo estudiados entre los grupos según tengan ITB patológico o normal. El estrés oxidativo se correlaciona con los valores de homocisteína y triglicéridos.



8. DISCUSIÓN

Es conocida la condición de la DM2 como multiplicador en la incidencia de complicaciones cardiovasculares, añadido a la presencia de factores de riesgo clásicos; relación ésta, presente ya en la fase presintomática (7). Estos datos insinúan una causalidad múltiple en donde pueden estar implicados, entre otros; numerosos polimorfismos, el estrés oxidativo y un estado crónico inflamatorio como se ha descrito con anterioridad. A su vez, no todos los diabéticos desarrollan con la misma gravedad la macroangiopatía por lo que es importante conocer la presencia de nuevos factores biológicos, así como polimorfismos genéticos relacionados con el estrés oxidativo en el paciente con DM2 según la presencia de arteriosclerosis.

8.1 Población General.

8.1.1 Población y parámetros generales.

El estudio se realiza en una población de diabéticos que acude a la consulta de un hospital de referencia y dos centros de especialidades; por lo que no es extraño que la población total del estudio sea de riesgo cardiovascular alto. Este incremento del riesgo viene reflejado en los parámetros descriptivos generales (**Tabla 1**) donde se advierte una edad y tiempo de evolución elevada, hipertensión leve pero cercana a los valores arbitrarios de grado 2 según las guías en vigor, obesidad abdominal que se refleja en los elevados perímetros de la cintura; hiperglucemia en ayunas con elevación por encima de lo aceptable de la hemoglobina glucosilada, lo que puede hacer previsible una glucosa media estimada y postprandial de 175 mg/dl y 335 mg/dl respectivamente, afectación tanto renal como de la célula endotelial tal como refleja una microalbuminuria media de 108,65 mg/1 y un perfil lipídico con parámetros e índices aterogénicos elevados según estándares.

La población detallada es un factor a tener en cuenta para interpretar los resultados finales; dado que, el estudio limitado a sujetos diabéticos de riesgo elevado puede impedir alcanzar poder discriminatorio. Por tanto, se sugiere como limitación del presente estudio el hecho de que el ambiente hospitalario y en concreto la población de diabéticos incluidos pueden condicionar un riesgo elevado cardiovascular de la muestra; que se refleja en la prevalencia de complicaciones, los parámetros comentados previamente, así como la probable enfermedad arteriosclerótica vascular subyacente asintomática. Estos datos han de tenerse en cuenta a la hora de extrapolar los resultados a otras poblaciones de diabéticos. Por otro lado hay que considerar algunos estudios que ponen de manifiesto la desigual implicación de los factores de riesgo cardiovascular en el desarrollo de arteriosclerosis en diferentes regiones vasculares (33).

8.1.2 Enfermedad arterial periférica como marcador de arteriosclerosis y mortalidad.

Existe una comprensible interrelación entre todos los territorios vasculares, de tal forma que la enfermedad arterial periférica sería un marcador local de la arteriosclerosis

sistémica y reconocido factor independiente de mortalidad cardiovascular (34). El procedimiento más usado para su detección en la clínica diaria es el índice tobillo-brazo, porque cuantifica su gravedad y pronostica su evolución. Se ha utilizado en los estudios de cohortes poblacionales realizados en Estados Unidos y Europa; en los cuales un ITB $< 0,9$ se ha asociado a una mayor incidencia de mortalidad, infarto de miocardio e ictus. El aumento de estos riesgos relativos no depende de la presencia de factores de riesgo o de enfermedad cardiovascular en el momento inicial, lo que sugiere que el ITB puede desempeñar un pronóstico de mayor riesgo cardiovascular subyacente (35).

La revisión de la bibliografía muestra que el diagnóstico de enfermedad arterial periférica asociado a la DM2 comporta una evolución más mórbida (36), lo que identifica a los sujetos con mayor riesgo. Por todo ello con fines de valoración de riesgo cardiovascular elevado, se establece el ITB $< 0,9$ (7) para identificar al llamado “paciente vulnerable” dentro de la población del estudio. Es posible, como limitación, que algunos sujetos con una calcificación en la media e ITB bajo no se hayan diagnosticado de riesgo elevado debido a un falso aumento del ITB.

La **Tabla 2** muestra la correlación positiva y significativa entre el índice ITB y la clínica de vasculopatía periférica evaluada con el cuestionario de Edimburgo (**Tabla 10**). Se confirma la baja rentabilidad de este cuestionario, en gran medida explicada por la elevada proporción de pacientes con enfermedad arterial periférica asintomática, como recientemente ha publicado Ena et al (37) sobre la población de Villajoyosa, semejante a la nuestra.

8.1.3 Parámetros clínicos.

El hábito de fumar (**Gráfica 2**) es mayor en los pacientes con afectación periférica vascular, de acuerdo con la literatura. Otro aspecto a detallar es la prevalencia de la obesidad y los datos recogidos del perímetro de la cintura (**Tabla 3**) reflejo de los desórdenes metabólicos de la población global del estudio. Datos que acreditan la estrecha y compleja relación con la DM2 o con la enfermedad cardiovascular. Bajo este estrés metabólico los adipocitos desencadenan una respuesta inflamatoria que origina la secreción de proteínas de fase aguda y la producción de estrés oxidativo (38).

La edad es significativa, pero no así el tiempo de evolución de la diabetes (**Tabla 3**). Hay que señalar que solo se dispone de información básica reseñada por el propio paciente y en consecuencia, es posible, que los resultados sean propensos a un error de estimación de los años de evolución de la DM2. No obstante la información concuerda con los datos de la literatura en que la prevalencia de enfermedad arterial periférica aumenta con la edad: alrededor del 5% en menores de 50 años y superior al 20% en mayores de 65; así como en hombres.

La hipertensión arterial es un factor acreditado de riesgo de enfermedad arterial periférica y condicionante de mayor grado de mortalidad y morbilidad en portadores de esta

enfermedad. De la misma manera, la limitación de la información referida por el paciente origina que los resultados (**Tabla 4**) se alejen del análisis de prevalencia de hipertensión del estudio Di@betes (39), a pesar de ser ésta una población con edad media > 60 años, obesa y con incidencia de eventos cardiovasculares elevados, factores descritos como definitorios en el citado estudio.

Durante la justificación de la tesis la enfermedad vascular periférica es descrita como una manifestación habitual de macroangiopatía en la DM2 y con un pronóstico desfavorable de episodios cardíacos y cerebrales (34). No sorprende, por tanto, que el ITB contraste una diferencia estadísticamente significativa en la incidencia de episodios cardiovasculares según muestra la **Gráfica 3**, coincidiendo con los resultados del estudio MESA (40).

La aparición y progresión de la retinopatía diabética depende de una serie de factores biológicos, genéticos y ambientales, a los que se unen marcadores de riesgo de reciente conocimiento (41). A pesar de conseguir un control estricto de los factores de riesgo convencionales queda un riesgo residual de hasta un 50%, como queda demostrado en el estudio STENO-2. Nuestros resultados de prevalencia (**Tabla 9**) concuerdan con los datos en España. Hay un extenso convencimiento de la relación entre retinopatía y tiempo de evolución de la DM2 siendo éste elevado en la población del estudio. La retinopatía se relaciona en los resultados positivamente con la macroangiopatía medida por ITB, posiblemente por la presencia de un mayor nivel de dislipemia significativo y un resultado no significativo de lipoproteínas ricas en triglicéridos que se han asociado a la microangiopatía (42) y específicamente a retinopatía en el estudio ETDRS. Dado que la retina se caracteriza por ser extremadamente rica en membranas con lípidos poli-insaturados, se plantea que la peroxidación lipídica constituye un mecanismo patogénico mediante el cual el estrés oxidativo daña esta estructura (43).

En referencia a la polineuropatía, el escaso número por grupo determinado según NDS impide resultados representativos para su valoración (**Tabla 11**). Los resultados del tratamiento para la DM2 (**Tablas 12 y 13**) muestran una mayor proporción de pacientes con tratamiento doble con insulina y antidiabéticos orales en el grupo de menor ITB.

8.1.4 Perfil lipídico.

Aunque las anomalías del metabolismo de las lipoproteínas son un componente destacado en la patogenia de las complicaciones vasculares de la DM2; solo el cociente cLDL/cHDL es significativo, ver **Tabla 5**. El índice aterogénico cLDL/cHDL, de utilidad diagnóstica acreditada por su peso estadístico en la predicción de episodios cardiovasculares, es superior en ambos grupos a los objetivos de prevención en pacientes de alto riesgo cardiovascular. El resto de parámetros del metabolismo de los lípidos muestra en su conjunto unos resultados sin diferencias entre los dos grupos definidos; pero con mayor alteración de parámetros en la población con ITB disminuido; como lo marca la diferencia estadística en

el diagnóstico de dislipemia, ver **Tabla 6**.

Conviene poner de relieve que se desconoce el tamaño y composición de las partículas de LDL por no ser motivación prioritaria del estudio, pero es presumible por el perímetro de la cintura y el patrón B. Un examen conjunto de los resultados muestra un valor elevado de colesterol no HDL reflejando una posible presencia de partículas LDL pequeñas y densas (44). Por otro lado, se ha descrito que las partículas LDL pequeñas y densas aumentan con el mal control de la glucemia en la DM2, y disminuyen con el tratamiento intensivo incluso con hemoglobina glucosilada mayor a la de la población del estudio (45). Asimismo, se ha referido una correlación inversa entre los valores de cHDL, en rango normal en este ensayo y la presencia de LDL con patrón B (45). Es sabido que el patrón o fenotipo B de las partículas LDL muestra una mayor capacidad aterogénica; los estudios experimentales revelan que el tamaño y composición de éstas es determinante para su capacidad de penetración en la pared arterial, la condición de ser captadas por los proteoglicanos y ser sustrato de oxidación. Por otra parte, no se debe soslayar las sólidas pruebas acumuladas durante los últimos años, que indican que niveles menores de cLDL pueden ser demasiado elevados si se presentan con otros factores de riesgo. Sin diferencias entre grupos, reflejo del riesgo cardiovascular de la población de estudio, destacan las alteraciones cualitativas de las lipoproteínas ricas en triglicéridos que juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades coronarias (46, 47).

La **Tabla 7** muestra el tratamiento de la dislipemia siendo éste significativo y mayor para aquellos con ITB < 0,9, aunque también refleja un insuficiente seguimiento en la población del estudio.

Los niveles de cHDL vaticinan de forma inversa e independiente la enfermedad vascular, incluso cuando se reduce el nivel de cLDL por debajo de 70 mg/dl y existen evidencias recientes que muestran que el incremento de cHDL se relaciona con la regresión de la placa de ateroma. Por todo ello se viene proponiendo que la elevación del cHDL debe ser considerada como estrategia terapéutica (48). Aunque no están establecidos los objetivos terapéuticos para el cHDL los resultados muestran unos niveles mayores de cHDL en la población con ITB superior a 0,9 (**Tabla 5**). La diferencia de 2 mg/dl entre ambos grupos constituye un incremento entre el 4 y el 6% de riesgo en cardiopatía isquémica, independiente de otros factores de riesgo en la población con menor ITB (49), que puede ser mayor en mujeres. Recientemente los resultados del estudio REALIST muestran el umbral de cLDL de 125 mg/dl como referencia de un mayor o menor efecto protector del cHDL.

8.1.5 Homocisteína y polimorfismo genético.

Uno de los resultados a valorar por su significación estadística es la asociación de la homocisteína con la macroangiopatía diabética (**Tabla 8**). En los últimos años han aparecido numerosos estudios que examinan éste y otros novedosos factores de riesgo en la

población con arteriosclerosis que, al igual que los tradicionales, cabe esperar sean también más prevalentes. Numerosos estudios observacionales y de caso-control han encontrado una relación entre hiperhomocisteinemia y la enfermedad cardiovascular en diabéticos (50, 51) así como en su pronóstico o recurrencia (52). Hay debate en la posibilidad de que la homocisteína sea un factor de riesgo más potente para enfermedad arterial periférica que para cardiopatía isquémica (53) y que la homocisteína pueda no estar involucrada en las etapas tempranas de la aterogénesis sino que juegue un papel importante en su progresión. Los estudios exponen relación con pacientes de alto riesgo, lo cual podría ser consistente con que la hiperhomocisteinemia se relacione, modulada por la diabetes y el hábito tabáquico, con las fases tardías del proceso de arteriosclerosis. La asociación entre la concentración de homocisteína y la DM2 se ha examinado en una serie de publicaciones donde ésta es una característica de la insulinoresistencia (54) observándose correlación negativa entre las concentraciones de insulina y homocisteína, incluso dentro del intervalo de referencia reconocido de la homocisteína y sin diferencias en el ácido fólico (55). Los resultados son conformes con los observados en la literatura y muestran que la población con enfermedad arterial periférica presenta valores significativos más elevados de homocisteína y no significativos de hemoglobina glucosilada o tabaquismo. Subrayar la imposibilidad de conocer la contribución de factores reconocidos (51) como el sexo masculino y la insuficiencia renal en la elevación de este parámetro.

Durante los últimos años la presencia de las variantes polimórficas de los genes comprometidos en el metabolismo de la metionina, como la cistationina sintetasa (CBS) y la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), se han asociado con riesgo de enfermedad vascular. Estas variantes han sido investigadas como factores de riesgo de la enfermedad oclusiva vascular en numerosos estudios de caso-control. Aunque en la mayoría la asociación está presente, no lo es en su totalidad con resultados finales no concluyentes (56-57). Se calcula los polimorfismos con la intención de validar esta asociación y con el test de χ^2 su asociación con enfermedad vascular medida por ITB. Los resultados (**Tablas 17 a 19**) no han podido registrar asociación de las variantes polimórficas de la MTHFR 1298, MTHFR 677 y CBS 1080 en la población estudiada aunque sí una hiperhomocisteinemia moderada basal.

8.1.6 Parámetros bioquímicos.

Cabe destacar por su significación estadística el Log Lp(a) (**Tabla 8**). La Lp(a) es una conocida partícula similar al LDL que tiene una alta afinidad por los proteoglicanos de la íntima. Sus valores están establecidos sobre todo por el gen LPA, por lo que el riesgo es vitalicio. Se distinguen diversos mecanismos que explicarían su poder aterogénico, pero no la contribución relativa de cada uno de ellos. Se ha descrito experimentalmente la relación con la arteriosclerosis de su componente lipoproteico de baja densidad, el componente apo (a), la capacidad de potenciación de la inflamación y apoptosis debido a su contenido en

fosfolípidos oxidados y su efecto protrombótico al frenar la fibrinólisis (58). No está esclarecido si la resistencia a la insulina o la diabetes misma influye sobre las concentraciones de Lp(a). Aunque el Emerging Risk Factors Collaboration, un meta-análisis de 36 estudios prospectivos, muestra una relación débil, cada vez hay más estudios que ponen de manifiesto que estas partículas pueden ser un factor de riesgo causal e independiente a los niveles de cLDL de futuras complicaciones relacionadas con la enfermedad arterial periférica y la enfermedad coronaria (59-60).

El fibrinógeno es significativamente mayor en la población con ITB $< 0,9$ (**Tabla 8**). En los últimos años numerosos estudios han examinado el fibrinógeno y otros marcadores inflamatorios para la prevención de enfermedad cardiovascular (61). Las asociaciones más robustas con el pronóstico que se han observado son, coincidiendo con los resultados, el fibrinógeno y la PCR, aunque esta última variable no lo es en nuestro estudio. Esta diferencia en la significancia es posible que sea así, debido al sustrato de inflamación crónica subyacente en la población y que el fibrinógeno es además un marcador de coagulación.

A pesar de que los datos epidemiológicos favorecen la idea de que el fibrinógeno elevado es factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares arterioscleróticas y mortalidad, no hay pruebas para pensar que sea un factor de riesgo modificable; por lo cual identificaría una población más susceptible al efecto deletéreo de los factores de riesgo mayores modificables. En este último sentido el fibrinógeno puede indicar en los diabéticos la susceptibilidad o mayor riesgo de eventos futuros, que son a su vez los que más se favorecerían con los tratamientos intensivos de sus factores de riesgo modificables.

8.1.7 Polimorfismo genético: xantinaoxidasa.

Cada vez hay más experiencias que muestran el estrés oxidativo como marcador de enfermedades cardiovasculares. Se le considera un mecanismo subyacente de la inflamación y de la disfunción endotelial y por tanto juega un papel en la aparición y progresión de las complicaciones de la DM2 (62). Uno de los principales sistemas conocidos de estrés oxidativo relacionados con la arteriosclerosis es la xantinaoxidasa, que para su compensación el organismo utiliza sistemas antioxidantes entre los que destacamos el sistema glutatión (GSS, GSR, GPX) (24). Su desequilibrio origina una serie de daños celulares que derivan en la arteriosclerosis (31). El ácido úrico es un marcador de la regulación de la actividad de la XO (63). Globalmente parece que la XO desempeña un papel importante en la producción de radicales libres en la diabetes.

Durante los últimos años en numerosos estudios caso-control, la presencia de las variantes polimórficas de los genes comprometidos en estos sistemas se ha asociado al riesgo de enfermedades isquémicas cardíacas en DM2 (21, 31). La intención de validar la asociación entre los polimorfismos y la enfermedad vascular medida por ITB nos motiva a su estudio, novedad con respecto a los estudios previos ya que en su mayoría están centrados

en la cardiopatía isquémica. Los resultados de las **Tablas 14 a 16** presentan una falta de asociación de las variantes polimórficas xo-337, xo-565 y xo-1936 entre las dos poblaciones divididas según ITB. Es posible que estos resultados sean debidos a que la población presenta un sustrato de estrés oxidativo latente.

8.2 Estrés oxidativo.

Se ha descrito en la justificación de la tesis el desequilibrio entre la actividad pro y antioxidante a favor de la primera; que conduce a modificaciones en la oxidación de macromoléculas junto a una disminución de la eliminación del exceso de ROS (64). Se ha propuesto este aumento como una de las causas a destacar de disfunción endotelial tanto en estudios experimentales como en clínicos relacionados con la arteriosclerosis (26). También la susceptibilidad a la oxidación de los lípidos plasmáticos y especialmente las partículas de LDL, proteínas, hidratos de carbono junto a los efectos genotóxicos por la oxidación de nucleótidos puede conducir al desarrollo de arteriosclerosis y complicaciones diabéticas (65) mediante la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis. Esta inestabilidad redox, con incremento de ROS, AGE y peroxidación lipídica, puede ser una vía común que relacione diversos mecanismos que convergen y explican las complicaciones macro y microangiopáticas que padecen los pacientes con DM2. Hoy conocemos que el estrés oxidativo se inicia en períodos precoces del proceso diabético; que la susceptibilidad de los diferentes tejidos a la exposición de los radicales libres en diabetes, tanto espontánea como experimental, es muy variada modificándose además con el desarrollo de la misma (66).

Para la confirmación del estrés oxidativo no hay métodos estandarizados. Por lo general se verifica de manera indirecta, aunque existe un método directo utilizando agentes secuestradores de espines y realizando las mediciones a través de la resonancia espectroscópica. Como métodos indirectos se cuenta con una batería de productos de la oxidación como marcadores biológicos ampliamente empleados en la investigación clínica y epidemiológica (67). La peroxidación lipídica es probablemente el proceso inducido por radicales libres más investigado. Los lipoperóxidos son compuestos inestables que tienden a degradarse rápidamente en una variedad de productos, todos ellos medibles, que incluyen: dienos conjugados, alcanos, productos aldehídicos (MDA o malonildialdehído) e isoprostanos. El procedimiento utilizado, más común en la bibliografía, es la medición del MDA acoplado al ácido tiobarbitúrico, cuyo resultado es el aducto cromogénico llamado TBARS (sustancia reactiva al ácido barbitúrico). Por otra parte, se han propuesto como marcadores biológicos de estrés oxidativo la estimación del sistema antioxidante a través de las enzimas SOD, GPX y CAT, o como en esta tesis calculando componentes no enzimáticos como el glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG). En la actualidad, las mediciones de las concentraciones de compuestos como el GSH y GSSG son esgrimidas para la evaluación del estrés oxidativo (68).

El tripéptido glutatión, principal antioxidante intracelular, existe tanto en forma de tiol reducido (GSH), como de disulfuro oxidado (GSSG). La capacidad neutralizadora del GSH radica en el grupo sulfhidrilo de la cisteína. De manera genérica puede intervenir de varias formas: disminuye la concentración de oxidantes, evita la iniciación de la reacción en cadena al reducir los primeros radicales libres que se crean, evita la formación de especies reactivas al unirse a iones metálicos, transforma los peróxidos en productos menos reactivos y detiene la propagación y aumento de radicales libres. El aumento de ERO contribuye a la disminución de las defensas oxidantes, entre las que se incluye el GSH con el respectivo aumento del glutatión oxidado (GSSG). Se ha destacado que un incremento del estrés oxidativo mitocondrial origina un mecanismo de retroalimentación positiva en el que se activa la vía de los polioles y en consecuencia una disminución de NADPH, que como cofactor de las enzimas generadoras de GSH reducen éste (69). También existe una disminución de las defensas oxidantes, entre las que se incluye el GSH y un aumento del estrés nitrosante, lo que implica un incremento de radical peroxinitrico, que es un potente oxidante lipídico (70), especialmente de los poli-insaturados. Numerosos estudios han mostrado la abundante presencia de productos derivados de la peroxidación lipídica en la sangre y en los tejidos de la DM2 (71). Como se ha comentado la manera más común utilizada es la medición del MDA, conocido marcador de estrés oxidativo y de la presencia de complicaciones graves en la DM2.

8.2.1 Parámetros descriptivos del subgrupo.

Dado el cúmulo de evidencias experimentales que apuntan al estrés oxidativo como factor determinante en el comienzo y progresión de la macroangiopatía diabética (72) y existiendo una correlación entre el nivel de control metabólico y el grado de severidad del estrés oxidativo en DM2 (73), es de interés medir marcadores de estrés oxidativo en individuos diabéticos con vasculopatía periférica; dadas las escasas referencias bibliográficas. Para ello y por motivos de costes, se selecciona de forma aleatoria 70 pacientes de la cohorte total en dos grupos iguales en número, de acuerdo con el objetivo de examinar la asociación de determinados marcadores de estrés oxidativo con la presencia de vasculopatía periférica. La población es seleccionada aleatoriamente y apareada por edad, género, índice de masa corporal, gravedad del ITB y tiempo de evolución de la diabetes.

Una mirada general de los resultados (**Tabla 21**) muestra que el subgrupo de pacientes seleccionados de la cohorte de diabéticos tipo 2 presenta un estrés oxidativo subyacente, coincidiendo con otros autores (74), expuesto por niveles elevados de GSSG y de MDA junto a los menguados de GSH. Reiterar, como se muestra en las **Tablas 21, 22**, que la población seleccionada es de riesgo cardiovascular elevado. Cabe destacar, por tanto, este riesgo elevado como limitación que impide alcanzar poder discriminatorio a los resultados.

Se ha documentado que los sistemas antioxidantes disminuyen con la edad. Premisa

que ha influido en los resultados de los parámetros que corroboran el estrés oxidativo; pero no en la intención de validar diferencias entre los marcadores en individuos diabéticos tipo 2 con vasculopatía periférica o no medida por ITB; ya que tiene un tiempo de evolución medio de la diabetes superior a diez años sin diferencias entre grupos.

Valorar por su significación estadística la mayor incidencia de cardiopatía isquémica (**Tabla 24**) en los pacientes con menor ITB; en concordancia con los hallazgos que relacionan el aumento de los radicales libres y la oxidación de las lipoproteínas en la diabetes, con una elevación de la enfermedad y la mortalidad cardiovascular (72, 75).

Es conocida la asociación entre las elevadas concentraciones de glucosa y los valores disminuidos de GSH (76) o elevados de MDA (74). En los resultados no se observan cambios significativos en los marcadores de estrés oxidativo en plasma de los pacientes con vasculopatía periférica comparado con los controles, ver **Tabla 22**. Incluso los niveles son levemente más elevados en MDA en los controles. Hay que considerar que los efectos sobre las medidas de marcadores antioxidantes a nivel sistémico requieren de un tiempo mayor para su normalización que para la glucemia. La hiperglucemia crónica junto a su propia variabilidad diaria que experimenta la DM2, son reconocidos factores que activan el estrés oxidativo y otros parámetros inflamatorios contribuyendo al desarrollo de la macroangiopatía clínica y subclínica (77). Es de destacar en este sentido, una hemoglobina glucosilada 0,25 puntos superiores en los controles, lo que sugiere un peor control metabólico a largo plazo. Como ya se ha comentado con anterioridad el estrés oxidativo se inicia en etapas tempranas de la DM2 por lo que es posible que el estrés sea notorio y sin diferencias entre ambos grupos, como se ha descrito en otros procesos (78).

Por otra parte, sin diferencias entre grupos, hay que reparar en la presencia de la obesidad y perímetro de la cintura elevado reflejo de los desórdenes metabólicos subyacentes. Bajo este estrés metabólico se ha documentado que los adipocitos desencadenan una respuesta inflamatoria que promueve la secreción de proteínas de fase aguda y la producción de estrés oxidativo (37).

8.2.2 Parámetros lipídicos.

En los parámetros del metabolismo de los lípidos detallados en la **Tabla 21** se refleja, en su conjunto, un posible fenotipo asociado de dislipemia aterógena con triglicéridos mayores en la población control, índices aterogénicos e indicadores del tamaño de las partículas LDL que apuntan un riesgo elevado cardiovascular tanto en las complicaciones macro como microvasculares (79). Todas las conocidas lipoproteínas plasmáticas pueden sufrir los daños derivados de la oxidación de sus lípidos. La alteración de la lipoproteína de muy baja densidad (partículas VLDL) puede afectar a la aclaración de los triglicéridos plasmáticos (80). Los resultados correlacionan, aunque débilmente, el estado redox con los triglicéridos y el colesterol total. La peroxidación de las partículas de LDL constituye, quizás,

la mayor contribución de los radicales libres a la génesis y agravamiento de la arteriosclerosis y en los DM2 con control no aceptable existe una mayor susceptibilidad de las partículas LDL a la oxidación (80).

8.2.3 Homocisteína.

Desde los estudios experimentales de McCully en 1969 existen numerosos estudios observacionales y prospectivos que han establecido, no sin alguna controversia (81), que los valores moderadamente elevados de homocisteína circulante constituyen un importante factor de riesgo independiente para el desarrollo y progreso de la arteriosclerosis (82,83). Aunque no se conoce con exactitud cómo la hiperhomocisteinemia contribuye al desarrollo de la enfermedad cardiovascular, se ha involucrado la lesión endotelial mediante mecanismos oxidativos entre otros (84). Hay que recordar que debido al valor del pKa de su grupo tiol (pKa=8,9) en el pH fisiológico, la homocisteína se oxida rápidamente para formar diversos tipos de disulfuros; de hecho la homocisteína libre y reducida en plasma supone menos del 2% del total plasmático. La principal fracción oxidada (80-85%) es la unida a las proteínas, principalmente albúmina. Los resultados muestra una débil correlación entre la homocisteína con la edad, GSH y tiempo de evolución. Los resultados pueden ser coherentes con que la hiperhomocisteinemia se asocia a las fases tardías del proceso de arteriosclerosis, dado que coinciden con numerosos estudios que han encontrado una correlación entre hiperhomocisteinemia con la edad y el tiempo de evolución (85, 51). Para el análisis de la débil correlación, resaltar de nuevo que la población estudiada muestra escasa diferencia en los parámetros de riesgo cardiovascular y marcadores de estrés oxidativo por lo que puede inferirse un sustrato endotelial con inflamación y estrés oxidativo solo levemente superior en la población con menor ITB.

8.2.4 Correlaciones.

Se encuentra correlación (**Tablas 25-28**) entre los valores de GSSG con MDA con valor $r = 1$ ($p < 0,0001$). Se aprecia una débil correlación entre los valores de GSH con triglicéridos con valor $r = -0,251$ ($p = 0,03$) y con homocisteína con valor $r = 0,271$ ($p = 0,026$). De la misma forma se halla una débil correlación entre los valores de GSSG o MDA con triglicéridos con valor $r = 0,222$ ($p = 0,05$) y con el colesterol total con valor $r = 0,204$ ($p = 0,08$). Finalmente también se correlaciona débilmente la homocisteína con la edad con valor $r = 0,401$ ($p = 0,001$), con GSH con valor $r = 0,271$ ($p = 0,026$) y con el tiempo de evolución con un valor $r = 0,233$ ($p = 0,05$).

8.3 Limitaciones.

Si bien es cierto que los resultados son congruentes con los reseñados en la literatura, son débiles los resultados. Se desconoce si las correlaciones estudiadas son débiles

o si la población carece del poder de ponerlas de manifiesto. Se puede conjeturar que los resultados han sido moderados por la población de estudio, diabéticos tipo 2 con alto riesgo cardiovascular. Se describe como limitación que el riesgo elevado cardiovascular latente de la muestra ha de tenerse en cuenta a la hora de extrapolar los resultados a otras poblaciones de diabéticos. Por otra parte, la asociación positiva encontrada entre triglicéridos y colesterol o edad y tiempo de evolución, incluidas en el modelo de regresión multivariado puede sugerir un problema de colinealidad. Creemos que las tendencias detectadas podrían haber alcanzado la significación estadística con otro modelo. El estrés oxidativo se inicia en períodos precoces del proceso diabético; es verosímil que para evaluar mejor las correlaciones se debería haber valorado un grupo control sin diabetes o con diabetes más incipiente, como hemos descrito durante la discusión.



9. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos del estudio establecemos las siguientes conclusiones:

En los sujetos con diabetes tipo2 (grupo completo):

1. La presencia de macroangiopatía diabética evaluada por ITB patológico se relaciona significativamente con el cociente LDL/HDL y el tratamiento de dislipemia, con el fibrinógeno y niveles plasmáticos de homocisteína, así como con los antecedentes de episodios isquémicos cardíacos y edad.

2. No se encuentra asociación con polimorfismos genéticos relacionados con el estrés oxidativo: xo-337A>G, xo-565+64T>C, xo-1936A>G, MTHFR 1298, MTHFR 677 y CBS 1080.

En el subgrupo seleccionado de forma aleatoria de la cohorte de diabéticos tipo 2 con un criterio estricto de apareamiento por edad, sexo, índice de masa corporal, gravedad de ITB y tiempo de evolución de la diabetes:

1. Existe elevación de los productos de oxidación y descenso de los sistemas antioxidantes.

2. No existen diferencias significativas en los marcadores de estrés oxidativo estudiados entre los grupos según tengan ITB patológico o normal.

3. Los marcadores de estrés oxidativo se correlacionan con los niveles plasmáticos de triglicéridos y de homocisteína.



10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Godoy A. Epidemiología de la diabetes mellitus y sus complicaciones no coronarias. *Rev Esp Cardiol.* 2002; 55: 657-70.
- (2) IDF web.<http://www.diabetesatlas.org/> .
- (3) Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia.* 2012; 55: 88-93.
- (4) Crespo C, Brosa M, Soria-Juan A, López-Alba A, López-Martínez N, Soria B. Costes directos de la diabetes mellitus y de sus complicaciones en España (estudio SECCAID Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes). *Av Diabetol.* 2013; 29: 182-9.
- (5) Ruiz Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sánchez E, Corral-San Laureano F, Fernández-Fernández I. La diabetes mellitus en España: Mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. *Gac Sanit.* 2006; 20 (Supl 1): 15-24.
- (6) Natali A, Vichi S, Landi P, Severi S, L'Abbate A, Ferranini E, Coronary atherosclerosis in Type II diabetes: angiographic finding and clasical outcome. *Diabetologia.* 2000; 43: 632-41.
- (7) Laakso M, Lehto S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Rev.* 1997; 5:294-315.
- (8) Huxel R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ.* 2006; 332: 73-8.
- (9) Zheng ZJ, Rosamond WD, Chambles LE, Nieto FJ, Barnes RW, Hutchinson RG, et al. Lower extremity arterial disease assessed by ankle brachial index in a middle age population of Africans Americans and whites: the Atherosclerosis Risk in Communties (ARIC) Study. *Am J Prev Med.* 2006; 31 (Suppl 2): S 196-201.
- (10) Selvin E, Maninopoulos S, Berkenbilit G, Rami T, Brancanti FL, Powe NR, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2004; 141 (6): 421-31.
- (11) Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. En: *Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets.* Fisman EZ, Tenenbaum A (eds.) *Adv Cardiol.* Basel, Karger, 2008; 45: 1-16.
- (12) Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycosilation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006; 114: 597-605.
- (13) Ejido J, Hernández-Presa A, Tuón J, Blanco-Colio LM, Suzuki Y, Plaza JJ et al. El factor de transcripción B (NF-κB) y las enfermedades cardiovasculares. *Cardiovasc Risk Factors (ed.esp).* 2000; 9: 92-103.
- (14) Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Diabetes, other risk factor, and 12 year cardiovascular mortality for men screened in MRFIT. *Diabetes Care.* 1993; 16: 434-44.
- (15) Taskinen MR. Diabetic dyslipemia, from basic research to clinical practice. *Diabetologia.*

2003; 46: 733-49.

(16) Carmena R. Dislipemia diabética. En: Hiperlipemias. Clínica y Tratamiento. R Carmena y JM Ordovas. Ediciones Doyma SA, Barcelona 1999; 139-53.

(17) Ferranini E, Natali A, Capaldo B, Lehtovirta M, Jacobs S, Yki-Jarvinen H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: Role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). Hypertension. 1997; 30: 1144-1149.

(18) Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. Circulation. 2000; 102: 1082-85.

(19) Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. The Homocysteine Studies Collaboration. JAMA. 2002; 288: 2015-22.

(20) Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, et al. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. JAMA. 2006; 296: 2720-6.

(21) Madamanchi NR, Vendov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 29-38.

(22) Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF- κ B controls the global proinflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a proatherogenic program. Nucleic Acids Research. 2005; 33: 5308-19.

(23) Stocker R, Keane JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev. 2004; 84: 1381-1478.

(24) Mueller CFH, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox mechanisms in blood vessel. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 274-8.

(25) Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem. 2006; 52: 601-23.

(26) Vassale C, Botto N, Andreassi MG, et al. Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels as an index of oxidative stress in vivo for patients with coronary artery disease. Coron artery Dis. 2003 May; 14(3): 213-18.

(27) Doria A. Genetics of diabetes complications. Curr Diab Rep. 2010;10:467-75.

(28) Villeneuve LM, Natarajan R. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. Am J Physiol Renal Physiol. 2010; 299 :14-25.

(29) Gaikwad AB, Gupta J, Tikoo K. Epigenetic changes and alteration of Fbn1 and Col3A1 gene expression under hyperglycaemic and hyperinsulinaemic conditions. Biochem J. 2010; 432: 333-41.

(30) Marpadga A. Reddy and Rama Natarajan. Epigenetic mechanism in diabetic vascular complications. Cardiovasc Res. 2011; 90 (3): 421- 29.

(31) Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24: 816-823.

- (32) Asensi M, Sastre J, Pallardó F, et al. Determination of oxidized glutathione in blood: High-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymol.* 1994; 234: 367-71.
- (33) Krumholz HM, Chen J, Chen YT, Wang Y, Radford MJ. Predicting one-year mortality among elderly survivors of hospitalization for an acute myocardial infarction: results from the Cooperative Cardiovascular Project. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38: 453-9.
- (34) Criqui MH. Peripheral arterial disease-epidemiological aspects. *Vasc Med.* 2001; 6: 3-7.
- (35) Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, et al. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA.* 2008; 300: 197-208.
- (36) Ogren M, Hedbland B, Engström G, Janzon L. Prevalence and prognostic significance of asymptomatic peripheral arterial disease in 68-year-old men with diabetes. Results from the population study "Men born in 1914" from Malmö, Sweden. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005; 29: 182-9.
- (37) Ena J, Argente CR, Molina M, González-Sánchez V, Álvarez C E, Lozano T. Infradiagnóstico de enfermedad arterial periférica en pacientes con diabetes mellitus atendidos en consultas de segundo nivel. *Avances en Diabetología.* 2013; 29 (6): 175-81.
- (38) Hotamisligil GS, Erbay E: Nutrient sensing and inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 923-934.
- (39) Valdés S, García-Torres F, Maldonado-Arraque C, Goday A, Calle-Pascual A, Soringuer F, Castaño L, Catalá M, Gomis R, Rojo-Martínez G. Prevalencia de obesidad, diabetes mellitus y otros factores de riesgo cardiovascular en Andalucía. Comparación con datos de prevalencia nacionales. Estudio Di@bet.es. *Rev Esp Cardiol.* 2014; 67: 442-8.- Vol. 67 Núm.06 DOI: 10.1016/j.recesp.2013.09.031.
- (40) Matthew J. Budoff, Robyn L. McClelland, Khurram Nasir, Philip Greenland, Richard A. Kronmal, George T. Kondos, Steven Shea, Joao A. C. Lima, Roger S. Blumenthal. Cardiovascular events with absent or minimal coronary calcification: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am Heart J.* 2009; 158: 554-61.
- (41) Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Annual Review of Diabetes (ADA).* 2005; 3: 45-56.
- (42) Ucgun NI, Yildirim Z, kilic N, Gürsel E. The importance of serum lipids in exudative diabetic macular edema in type 2 diabetic patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1100: 213-7.
- (43) Grupa MM, Chari S. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with diabetic retinopathy. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2005; 49 (2): 187-92.
- (44) Millán J, Brea A, Díaz A, González-Santos P, Hernández-Mijares A, Mantilla T, Pérez Botet J, Pintó X, Simó R. Dislipemia: de la fisiopatología al manejo clínico de la dislipemia aterogénica. *Clin Invest Hot topics.* 2013; 6(2): 13-19.
- (45) Koska J et al. The Effect of Intensive Glucose Lowering on Lipoprotein Particle Profiles and Inflammatory Markers in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VDAT) *Diabetes Care.*

August 1, 2013; 36: 2408-2414.

(46) Ginsberg NH. Hypertriglycerdemia: new insights and new approaches to treatment. *Am J Cardiol.* 2001; 87: 1174-1180.

(47) Sacks FM, Aloupovic P, Moyé LA y cols. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation.* 2000; 102: 1886-1892.

(48) Barter P. HDL-C: Role as a risk modifier. *Atherosclerosis Supplement*, noviembre de 2011; 12(3): 267-70.

(49) Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castielli WP, Knke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989; 79: 8-15.

(50) Ciccarone E, Di Castelnuovo A, Archetti S, Ruggeri G, Salcuni N, et al. GENDIABE Investigators. Homocysteine levels are associated with the severity of peripheral arterial disease in Type 2 diabetic patients. *H Tromb Haemost.* 2003; 1: 2540-7.

(51) Hoogeveen EK, Kostense PJ, Beks PJ, Mackaay AJ, Jakobs C, Bouter LM, Heine RJ, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jan; 18(1): 133-8.

(52) Karolczak K, Olas B. Mechanism of Action of Homocysteine and Its Thiolactone in Homostasis System. *Physio Res.* 2009; 58: 623-633.

(53) Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein (a) and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA.* 2001; 285: 2481-5.

(54) Meigs JB, Jacques PF, Selhub J, Singer DE, Nathan DM, Rifai N, D'Agostino RB Sr, Wilson PW; Framingham Offspring Study. *Diabetes Care.* 2001 Aug; 24(8):1403-10.

(55) Bar-On H, Kidron M, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Rosenberg IH, et al. Plasma total homocysteine levels in subjects with hyperinsulinemia. *J Intern. Med.* 2000; 247: 287-94.

(56) Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from Mendelian randomisation. *Lancet.* 2005; 365: 224-31.

(57) Kolling K, Ndrepepa G, Werner K. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298 C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am. J Cardiol.* 2004; 93: 1201-05.

(58) Tsimikas S, Hall JL. Lipoproteína (a) como factor de riesgo en enfermedad cardiovascular de causa genética. *J. Am Coll Cardiol.* 2012; 60(8): 716-21.

(59) Gurdasani D, Sjouke B, Tsimikas S, Hovingh GK, Luben RN, Wainwright NW, Pomilla C, Wareham NJ, Khaw KT, Boekholdt SM, Sandhu MS. Lipoproteína (a) y riesgo de complicaciones coronarias, cerebrovasculares y periféricas: estudio EPIC-Norfolk. *Ateriocler*

Thromb Vasc Biol. 2012; 32(12): 3058-65.

(60) Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ for the JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 2008; 359: 2195–2207.

(61) Bickel C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Schlitt A, Rippin G, et al. Relation of markers of inflammation (C-reactive protein, fibrinogen, von Willebrand factor, and leukocyte count) and statin therapy to long-term mortality in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2002; 89: 901-8.

(62) Sheikh-Alí M, Chehade JM, Mooradian AD. The antioxidant paradox in diabetes mellitus. *Am J Ther.* 2011; 18: 266-78.

(63) Doehner W, Landmesser U. Xanthine oxidase and uric acid in cardiovascular disease: clinical impact and therapeutic options. *Semin Nephrol.* 2011; 31: 433-40.

(64) Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, et al. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2003; 107: 1486-91.

(65) Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996; 19: 257-67.

(66) Kakkar R, Kalra J, Mantha SV. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 1995; 151: 113-9.

(67) Sánchez-Rodríguez M, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica* 2004; 29: 81-90.

(68) Elejalde JL. Oxidación, entre la vida y la enfermedad. *An Med Interna.* 2001; 18 (1): 1-4.

(69) Inoguchi T, Natawa H. NADPH oxidase activation: A potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets.* 2005; 6 (4): 495-501.

(70) Cohen RA. Role of nitric oxide in diabetic complications. *Am J Ther.* 2005; 12 (6): 499-502.

(71) Beristain AS, Sánchez MA, Ruiz M, Mendoza VM. Estrés oxidativo como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, osteoartritis o hipertensión arterial en adultos mayores. *Bioquímica.* 2006; 31 (1):13-22.

(72) Zaccardi F, Pitocco D, Ghirlanda G. Glycemic risk factors of diabetic vascular complications: the role of glycemic variability. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009; 25: 199-207.

(73) Komosinska-Vassev K, Olczyk K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005; 68(3): 207-16.

(74) Gary WW. The radical view. *Free Radic Biol Med.* 1986; 548: 19-37.

(75) Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a

”casual” antioxidant therapy. *Diabetes care*. 2003; 26(5): 1589-96.

(76) Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y, Fujiwara Y, Shimad MKawakami Y. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism*. 1989; 38: 753-8.

(77) Monnier L, Mas E, Ginet C, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA*. 2006; 295: 1681-7.

(78) Payson Oberg B, McMenamin E, Lee Lucas F, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 65. 2004; 1009-16.

(79) Millán J, Pintó X, Muñoz A, Zúñiga M, Rubies-Prat J, Pallardó LF, et al. Cocientes Lipoprotéicos: significado fisiológico y utilidad de los índices aterogénicos en prevención cardiovascular. *Clin Invest Arterioscl*. 2010; 22(1): 25-32.

(80) Cruz HJ y cols. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*. 2011; 58 (1): 4-15.

(81) Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutter JA, Kuller LH. Homocysteine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vas Biol*. 1997; 17: 1947-53.

(82) Seshadri N, Robinson K. Homocisteína, Vit B y arteriopatía coronaria. *Medical Clinics of North America* (ed español). 2000; 84: 219-241.

(83) Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and endocrine system implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocrine Rev*. 1999; 20: 738-59.

(84) Papatheodorou I, Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation vascular in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9: 1941-58.

(85) MacCully KS, La revolución de la homocisteína: La medicina en el nuevo milenio I y II. *Cardiovascular*. 1999; 20: 1-17.