

# Bioquímica y Biología Celular de las complicaciones de la hiperglucemia

(*Diabetes tipo 11*)



## TITULACIÓN GRADO EN FARMACIA

- ✚ Alumna: [Raquel Castro Díaz](#)
- ✚ DNI: [54059942Y](#)
- ✚ Tutor: [Antonio F. Rodríguez del Castillo](#)
- ✚ Línea de Investigación: [Alteraciones congénitas del metabolismo](#)
- ✚ Área de conocimiento: [Bioquímica y Biología Molecular.](#)
- ✚ Facultad: [Farmacia.](#)



## ÍNDICE

	Pág.
Abstract:	3
Palabras clave.	4
1.- Introducción	4
2.- Objetivos	5
3.- Material y métodos	5
4.- Resultados :	
4.1- Ruta de los polioles (sorbitol)	5
4.2- Ruta de las hexosaminas	8
4.3- Glicosilación no enzimática	10
4.4- Activación de la Protein Kinasa C	19
4.5- Estrés oxidativo	21
5.- Conclusiones	26
6.- Referencias Bibliográficas	27





## Abstract:

---

Diabetes mellitus is a complex disease, where chronic hyperglycemia generates complications in different organs. In this circumstance, reactive oxygen species increase due to its autoxidation and other mechanisms, so that their metabolism favors the accumulation of metabolites such as fructose, sorbitol and triose phosphate. The latter generate highly reactive  $\alpha$ -oxoaldehydes with high capacity to bind proteins and generate oxidative stress. In turn, there is an increase in the synthesis of diacylglycerol from the phosphate trioses, which activate protein kinase C. In addition, the alteration between the proportions of the niacinamide nucleotides reduced with respect to the oxidized leads to a deficit of antioxidant systems. These metabolic imbalances cause impaired signal translation, such as abnormal gene expression, and tissue damage, providing a series of complications for patients with diabetes. But why does damage only occur in certain cells? The answer is that some cells can regulate glucose transport when exposed to hyperglycemia, keeping the glucose concentration constant. However; other cells lack this mechanism and suffer damage due to hyperglycemia. So, the explanation of the causes of diabetic complications involves mechanisms that occur within cells, rather than outside. On the other hand, the increase of ROS in the mitochondria produces DNA damage (chain breaks) activating PARP that breaks down NAD into nicotinic acid and ADP ribose. PARP then proceeds to form polymers that accumulate in GAPDH and other nuclear proteins. Which leads to further accumulation of the phosphate trioses and the problem worsens.

## Resumen:

---

La diabetes mellitus es una enfermedad compleja, donde la hiperglucemia crónica genera complicaciones en distintos órganos. En esta circunstancia aumentan las especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a la autooxidación y otros mecanismos, por lo que su metabolismo propicia la acumulación de metabolitos como la fructosa, el sorbitol y las triosas fosfato. Estas últimos generan  $\alpha$ -oxoaldehídos muy reactivos con alta capacidad de unirse a proteínas y generar más estrés oxidativo. A su vez se produce un aumento de la síntesis de diacilglicerol a partir de las triosas fosfato, las cuales activan a la proteína quinasa C. Además, el aumento de la proporción de los nucleótidos de niacinamida reducidos con respecto a los oxidados conduce a un déficit de los sistemas antioxidantes. Estos desequilibrios metabólicos causan alteración en la traducción de señales, como la expresión anormal de genes, y daño tisular, proporcionando una serie de complicaciones a los pacientes con diabetes. Pero, ¿por qué el daño solo ocurre en determinadas células? La respuesta reside en que algunas células





pueden regular el transporte de glucosa cuando están expuestas a la hiperglucemia, manteniendo la concentración de glucosa constante. Sin embargo; otras células carecen de este mecanismo y sufren un daño debido a la hiperglucemia. Por lo que la explicación de las causas de las complicaciones diabéticas involucra mecanismos que ocurren dentro de las células, en lugar de fuera. Por otro lado, el aumento de ROS en la mitocondria produce lesiones en el ADN (roturas de cadenas) activando a PARP que rompe el NAD en ácido nicotínico y ADP ribosa. Posteriormente PARP procede a formar polímeros que se acumulan en GAPDH y otras proteínas nucleares. Lo que conduce a que se acumulen aún más las triosas fosfato y se agrave el problema.

### **Palabras Clave:**

---

Diabetes mellitus, AGES, methylglyoxal, oxidative stress (ROS), sorbitol, protein kinase C, hexosamines, insulin resistance, GAPDH, NF- $\kappa$ B and poly (ADP-ribose) polymerase.

## **1.- Introducción**

---

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto de enfermedades metabólicas con un factor común: la hiperglucemia; que ocurre por un defecto en la secreción de insulina, en la respuesta periférica a la misma o ambas. Lo que conduce a un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos.

Las manifestaciones clínicas de la DM son variadas y en muchas ocasiones inespecíficas, aunque la mayoría de los signos y síntomas (hiperglucemia, poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y visión borrosa) están más relacionados con la hiperglucemia crónica o con la resistencia a la insulina. En la hiperglucemia crónica se afectan varios órganos en especial: el ojo, el riñón, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Y las complicaciones incluyen retinopatía con pérdida potencial de la visión, nefropatía y fallo renal, neuropatía periférica que se complica con úlceras y amputación en las piernas y neuropatía autonómica causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, y disfunción sexual.

Ya que el origen de las complicaciones crónicas de la DM en órganos y sistemas sensibles, es la hiperglucemia. El proceso debe estar relacionado con las reacciones químicas y los cambios metabólicos causados por el exceso de glucosa. Se ha postulado que la hiperglucemia puede causar complicaciones micro y macrovasculares asociadas a la diabetes mediante cinco mecanismos principales: acumulación y acción de AGEs; incremento de la ruta del sorbitol; aumento de la ruta de las hexosaminas; activación de isoformas de la PKC y aumento en el estrés oxidativo (ROS) (1).





## 2.- Objetivos

---

El objetivo de esta revisión es describir los mecanismos moleculares que postulan las diferentes hipótesis como responsables de las complicaciones crónicas de la DM.

## 3.- Material y métodos.

---

Las fuentes de información utilizadas en la elaboración del presente trabajo han sido: buscadores científicos y/o páginas webs tales como: NCBI, PubMed, Science Direct, etc. La búsqueda se hizo utilizando las palabras clave del trabajo. Las estructuras químicas se hicieron con el programa; ACD/chemSketch freeware.

## 4.- Resultados:

---

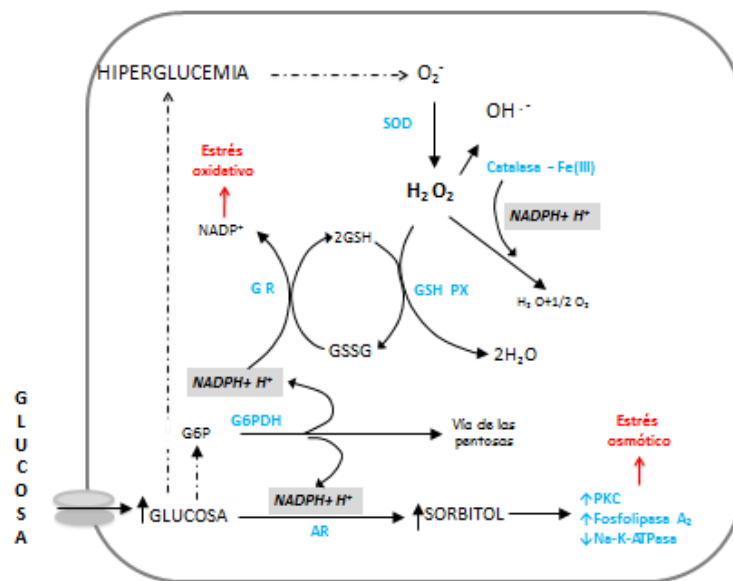
Los mecanismos que se han propuesto para explicar la fisiopatología de la DM son:

- A. Ruta de los polioles (sorbitol)**
- B. Ruta de las hexosaminas**
- C. Glicosilación no enzimática**
- D. Activación de la Protein kinasa C**
- E. Estrés oxidativo**

### A. Ruta de los polioles.

Aquellos órganos como: riñón, retina, cristalino, corazón y SNC, que son insulina-independientes para la captación de glucosa, acaparan las principales complicaciones de la hiperglucemia. En éstos la glucosa puede seguir ruta de los polioles; donde la glucosa se transforma por la acción sucesiva de la aldosa reductasa (AR), reducción irreversible de glucosa en sorbitol dependiente de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  y la sorbitol deshidrogenasa (SDH), que oxida el sorbitol a fructosa generando  $\text{NADH} + \text{H}^+$  respectivamente. Una consecuencia del consumo de NADPH es que disminuya la actividad de otras enzimas como la óxido nítrico sintetasa (eNOS), la glutatión reductasa (GR), la catalasa y la NADPH oxidasa. Lo que conlleva a la deficiencia de los sistemas antioxidantes en el paciente diabético (sistemas de glutatión y de la catalasa) **(Figura 1)**.



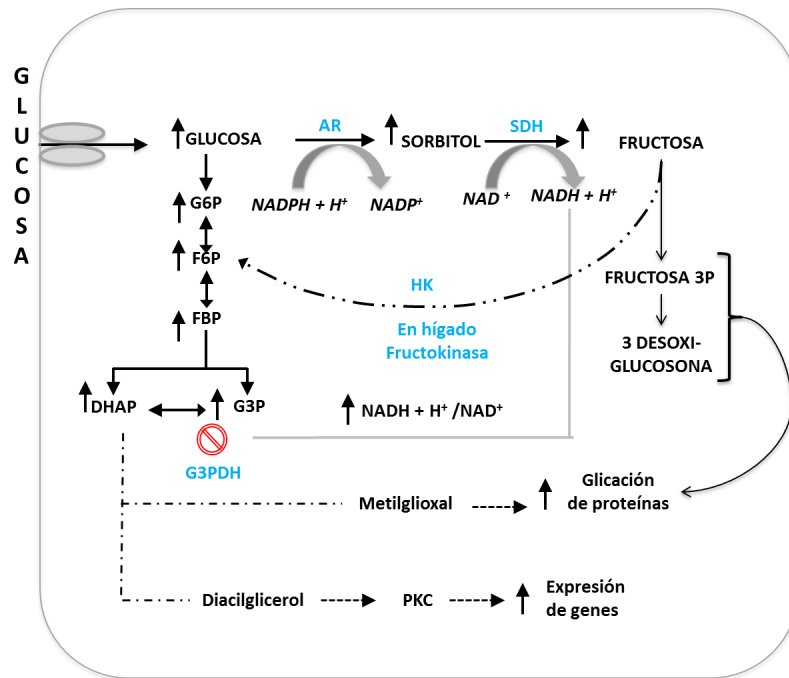


**Figura 1.** El glutatión es el principal antioxidante intracelular en respuesta a especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, radical hidróxilo y peróxidos orgánicos e inorgánicos) para ello es requisito indispensable que mantenga su forma reducida (GSH), por acción de la glutatión reductasa, sobre la forma oxidada (GSSG), lo que requiere del consumo de NADPH. Por otra parte, la activación de la catalasa también depende de NADPH (34 y 35 citado por 1). En la figura se muestra la formación de especies reactivas de oxígeno favorecidas por la hiperglucemia y disminución de los mecanismos antioxidantes por falta de NADPH. Esquema tomado de (1) con modificaciones.

La acumulación de la fructosa incrementa el flujo a través de la glucólisis (**figura 2**). En esta ruta; la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), es una de las reacciones más importantes. El acoplamiento entre la glucólisis y la vía del sorbitol conlleva a diversas alteraciones metabólicas como:

- I. Acumulación de G3P, y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que generan precursores de AGEs y estrés oxidativo.
- II. Aumento de la relación NADH/NAD<sup>+</sup>.
- III. Inhibición de la G3PDH, por la concentración intracelular elevada de glucosa.
- IV. Disminución de la expresión de G3PDH por la hipoinsulinemia; y un aumento de su degradación, causada por las concentraciones elevadas de NADH (39 y 41 citado por 1).
- V. Oxidación de sus grupos tiol (SH), como consecuencia del estrés oxidativo y/o glicación de la enzima. (40 y 43 citado por 1).





**Figura 2.** Repercusión del aumento de fructosa en la relación  $NADH/NAD^+$  y la vía glucolítica. PKC (proteína quinasa C), Hk (hexokinasa), G6P (glucosa 6 fosfato), F6P (fructosa 6 fosfato), FBP (fructosa 1,6, bifosfato), G3P (gliceraldehído 3 fosfato), DHAP (dihidroxiacetona fosfato), NADPH ( $NADPH + H^+$ ), NADH ( $NADH + H^+$ ). Esquema tomado de (1) con modificaciones.

La acumulación del sorbitol para algunas células (médula renal) es un mecanismo importante de osmorregulación en un medio hiperosmolar. Sin embargo, para otras células esto puede ser letal (el cristalino) (46 citado por 1).

En la hiperglucemia, la pobre difusión del sorbitol a través de la membrana externa de las células del cristalino y/o por la inhibición de la SDH, el sorbitol se acumula en el interior del cristalino generando:

a) Un aumento de la osmolaridad intracelular que promueve la entrada de líquidos hacia el interior de la lente, provocando una hidratación y tumefacción de las células del cristalino que, a su vez, provocan una alteración de la homeostasis del potasio, glutatión y aminoácidos, y que finalmente, se desencadena la opacidad del cristalino (cataratas).

b) Una alteración de la organización estructural de las proteínas cristalinas en el interior del cristalino (glicación de proteínas por entrecruzamientos de proteínas transparentes y presencia de radicales libres), estimulando la agregación, desnaturalización y precipitación de proteínas.





## B. Ruta de biosíntesis de las hexosaminas

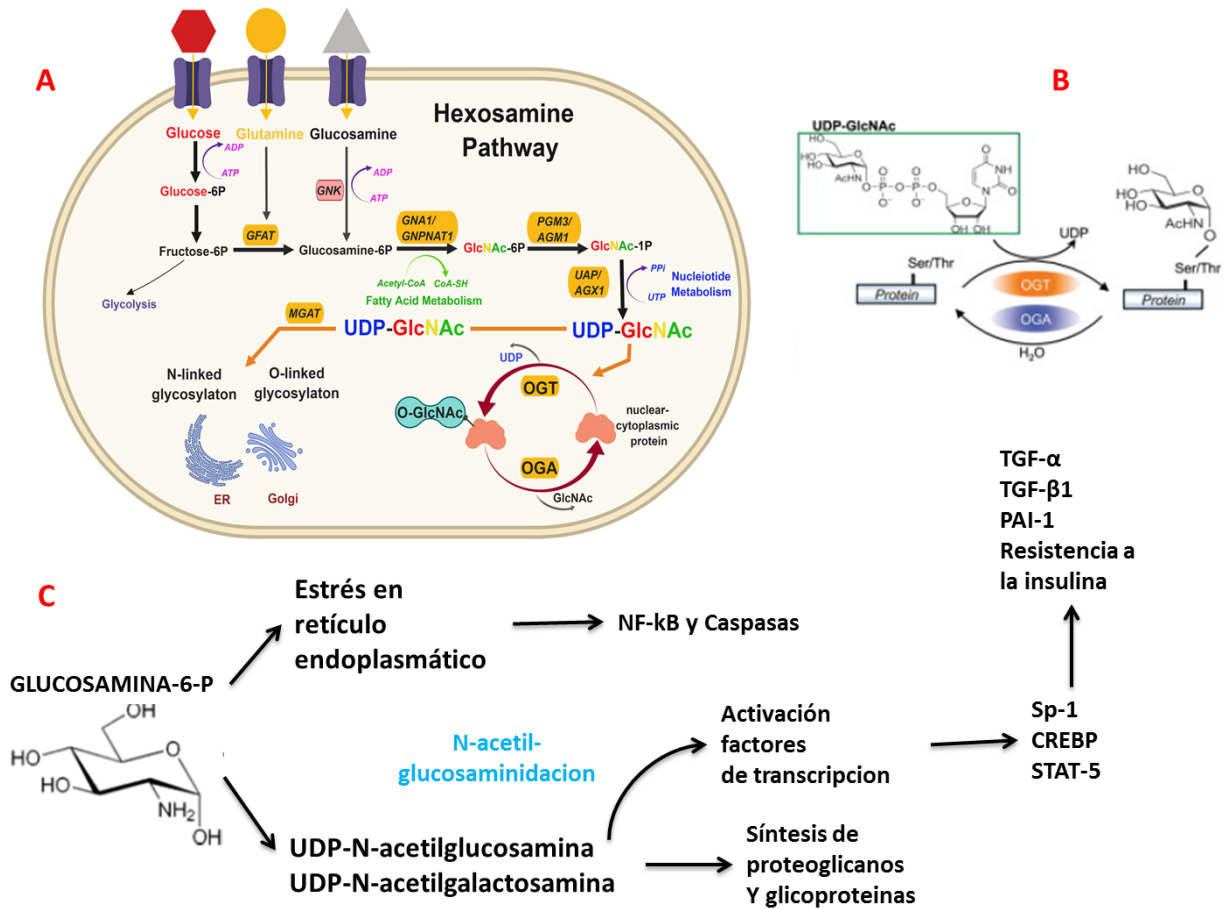
La glucosamina-6-fosfato se forma a partir de la fructosa-6-fosfato (a partir de la glucosa o de fructosa de la ruta del sorbitol) y glutamina; posteriormente en tres reacciones da origen a la UDP-N-acetilglucosamina y a la UDP-N-acetilgalactosamina. Ambas utilizadas en la formación de glicoproteínas y proteoglicanos (**figura 3A**). En la diabetes existe un aumento del flujo a través de esta vía, contribuyendo al aumento de la expresión de genes como los del TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 (50 citado por 1), y del inhibidor del activador del plasminogeno-1 (PAI-1) (51 citado por 1). Y también participa en la resistencia a la insulina (IR) inducida por lípidos e hiperglucemia (52 y 53 citados por 1). Se ha observado, administrando glucosamina, una correlación entre el incremento de UDP-N-acetilglucosamina y la actividad de la GFAT; con la baja captación de glucosa en los tejidos adiposo y muscular (54 citado por 1). Además, en transgénicos, la sobreexpresión de la enzima GFAT, incrementa la concentración de intermediarios de esta ruta y una disminución paralela de la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) a la membrana celular inducida por la insulina (55 citado por 1).

Los posibles mecanismos son:

- La glucosamina, inhibe la fosforilación y activación del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1).
- La proteína IRS-1 y el transportador GLUT 4, pueden modificarse a nivel postraducciona l por la adición de la N-acetilglucosamina (56 citado por 1).
- La N-acetilglucosamina compite por los sitios de fosforilación (serina y/o treonina) en la cascada de señalización de la insulina (**figura 3B**).
- La administración de glucosamina aumenta los enlaces “O-glicosídico” (O-NaGlc) en IRS-1 e IRS-2 en el músculo esquelético, disminuyendo la fosforilación de IRS-1 y el transporte de glucosa.







**Figura 3.** En (A) esquema simplificado de la ruta biosintética de las hexosaminas. La glucosa dentro de la célula en dos pasos se convierte en fructosa-6P (fructosa-6-fosfato), a continuación, el 95% aproximadamente continúa hacia la glicólisis y el 3–5% se convierte en glucosamina-6P (glucosamina-6-fosfato) por la enzima GFAT (glutamina: fructosa-6-fosfato amidotransferasa), utilizando la glutamina como segundo sustrato. GFAT cataliza el primer paso limitante en la formación de los productos de hexosamina y es el paso de regulación de la ruta. La GNA1/GNPAT1 (glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa) a continuación convierte la glucosamina-6P (la cual puede ser también captada por la célula) en GlcNAc-6P (N-acetilglucosamina-6-fosfato), utilizando acetyl-CoA procedente del metabolismo de los ácidos grasos. Esto luego se convierte en GlcNAc-1P (N-acetilglucosamina 1-fosfato) por PGM3/AGM1 (fosfoglucomutasa) y posteriormente a UDP-GlcNAc (uridina difosfato N-acetilglucosamina) por UAP/AGX1 (UDP-N-acetilhexosamina pirofosforilasa), utilizando UTP de la ruta del metabolismo de nucleótidos. UDP-GlcNAc se usa para glicosilaciones (N-linked y O-linked) en el ER and Golgi y para O-GlcNAc la modificación de proteínas nucleares y citoplasmáticas por la OGT (O-GlcNAc transferasa). La OGA (O-GlcNAc asa) cataliza la eliminación de O-GlcNAc y añade la GlcNAc al pool de HBP para reciclar a través de la ruta de salvamento. En (B) se muestran los residuos de glucosaminación, que en ocasiones son también puntos de fosforilación. En (C) se presenta un esquema con los principales cambios fisiológicos que ocurren por un incremento de esta vía. Tomado de (2) con modificaciones.





### C. Glicosilación no enzimática: (AGEs)

En la hiperglucemia crónica las macromoléculas se modifican por la reacción no enzimática de la glucosa y de otros carbohidratos -como la fructosa y la glucosa-6-fosfato o sus derivados- con las proteínas, ácidos nucleicos, y lípidos, para formar productos de glicación avanzada estables AGEs, (advanced glycation and products). Los AGEs se acumulan principalmente en los vasos de la retina y glomérulos renales (20 y 21 citado por 3).

Se sabe que la hiperglucemia intracelular es la causa principal de la formación de AGEs tanto intra como extracelulares; a partir de precursores dicarbonilos originados intracelularmente derivados de la glucosa o sus metabolitos (22 citado por 3).

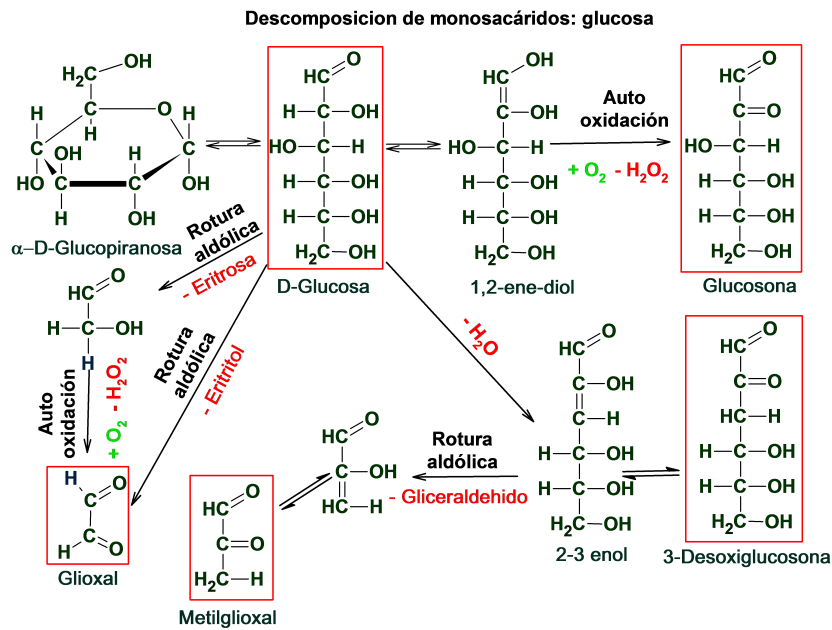
Los precursores de AGEs surgen a partir de:

- La autooxidación intracelular de glucosa a glioxal (**figura 4**).
- Descomposición del producto Amadori (aducto de 1-amino1-desoxifruktosa lisina, derivado de glucosa) a 3-desoxiglucosona, acelerado por una amadoriasa (**figura 5**). La 3-desoxiglucosona también se forma por la autooxidación de la glucosa catalizada por metales de transición, con la producción del radical superóxido (**figura 6**).
- La fragmentación de G3P y DHAP a metilglioxal (23 y 24 citados por 3) (**figura 7**).

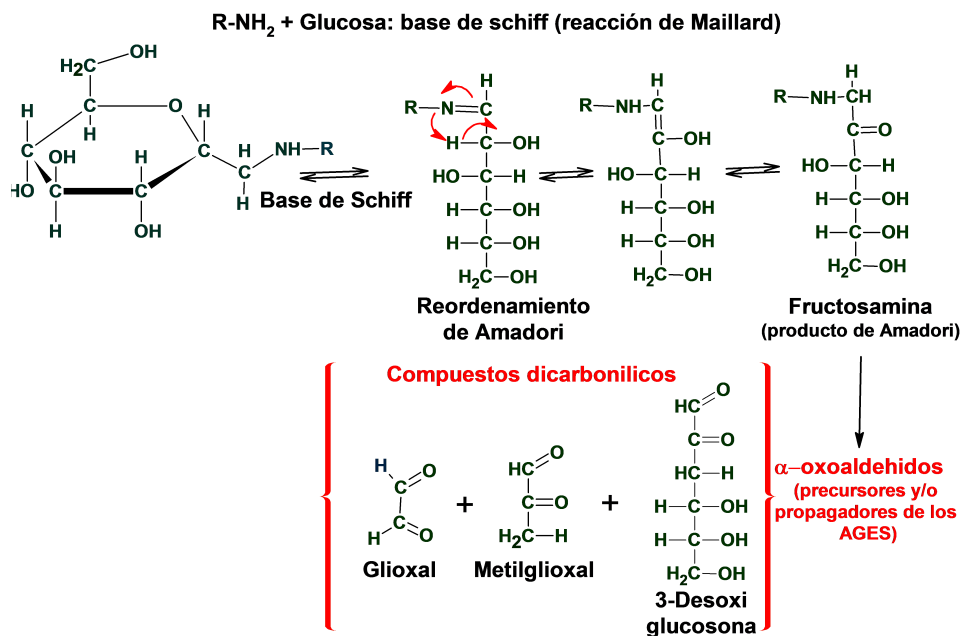
El glioxal, metilglioxal y 3-desoxiglucosona son precursores y/o propagadores de los AGEs; que por combinación simultáneamente con dos grupos reactivos de las proteínas, forman puentes cruzados entre ellas muy estables; produciendo su agregación y pérdida de sus funciones. Las proteínas ricas en aminoácidos básicos son especialmente susceptibles a la glicación. El metilglioxal y glioxal son detoxificados por el sistema de la glioxalasa; aunque también son sustratos de otras reductasas (**figura 8**).

Los AGEs tienen estructuras muy variadas; entre otros, podemos encontrar a la hidroximidazolona, puentes cruzados de bis (lisina) imidazolio, derivados de monolisina (N<sup>ε</sup>- (carboximetil)-lisina), argipirimidina y pentosidina (**figura 9** hay dos ejemplos) y en la **figura 10** se resume la relación entre metilglioxal y los AGEs.



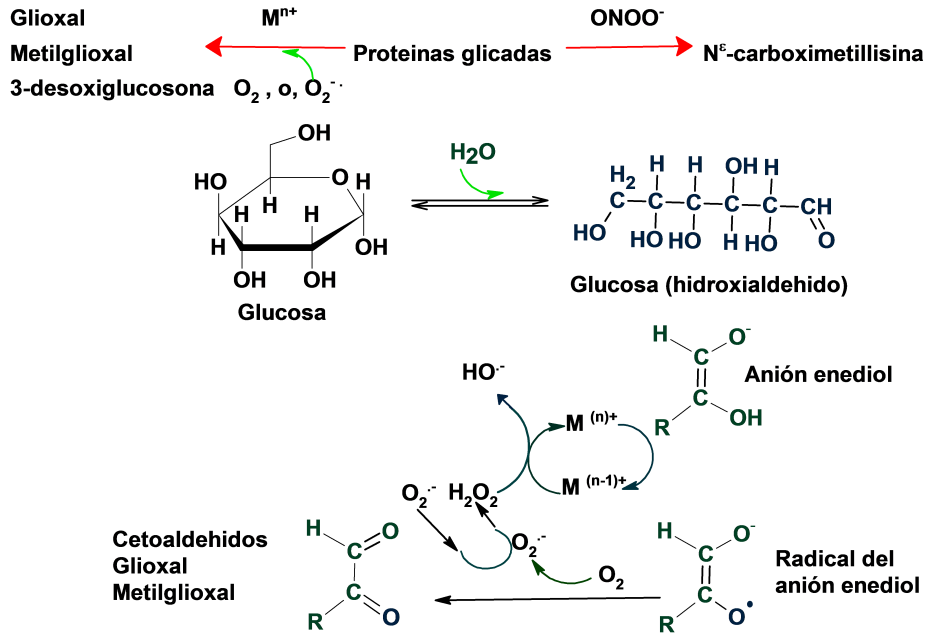


**Figura 4.** Interpretación mecanicista de la formación de glioxal, metilglioxal, 3-desoxiglucosona y glucosona en la degradación de la glucosa. Se muestran formas no hidratadas y acíclicas de productos de  $\alpha$ -oxoaldehído, aunque el glioxal y el metilglioxal existen en solución principalmente como monohidratos y dihidratos y 3-DG y glucosona como cíclicos. hidratados de hemiacetal y hemicetal. Tomado de (4)

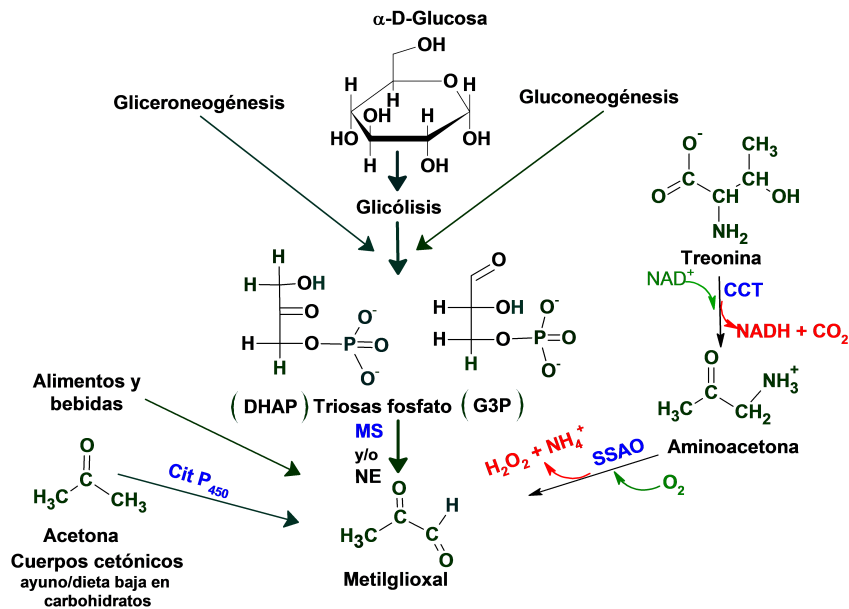


**Figura 5.** Interpretación mecanicista de la formación de glioxal, metilglioxal y 3-desoxiglucosona en la glicación temprana- RNH<sub>2</sub> representa la cadena lateral de un residuo de lisina y los grupos amino N-terminales. Tomado de (4).



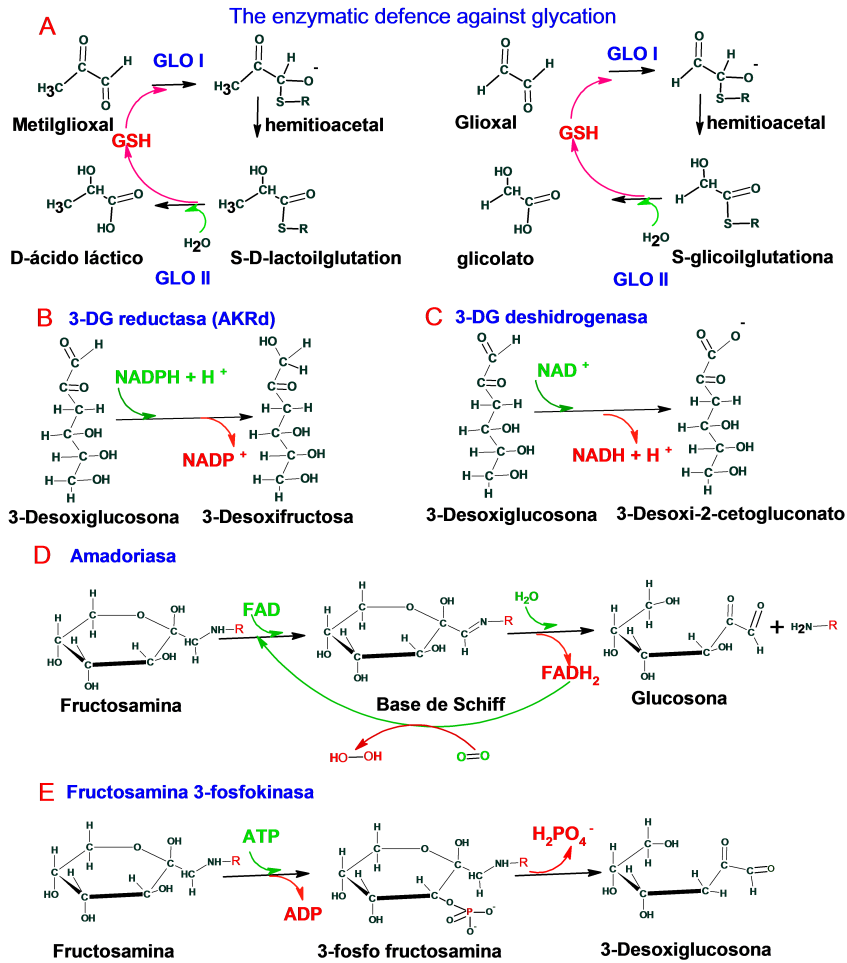


**Figura 6.** En presencia de metales de transición, la glucosa se autooxida, produciendo radicales libres oxidantes derivados del oxígeno ( $\cdot OH$ = hidroxilo;  $O_2^{\cdot-}$  = anión superóxido),  $H_2O_2$  y cetoaldehídos. Estos últimos -glioxal y metilglioxal- también se producen como propagadores en la glicosilación de proteínas. Tomado de (5).

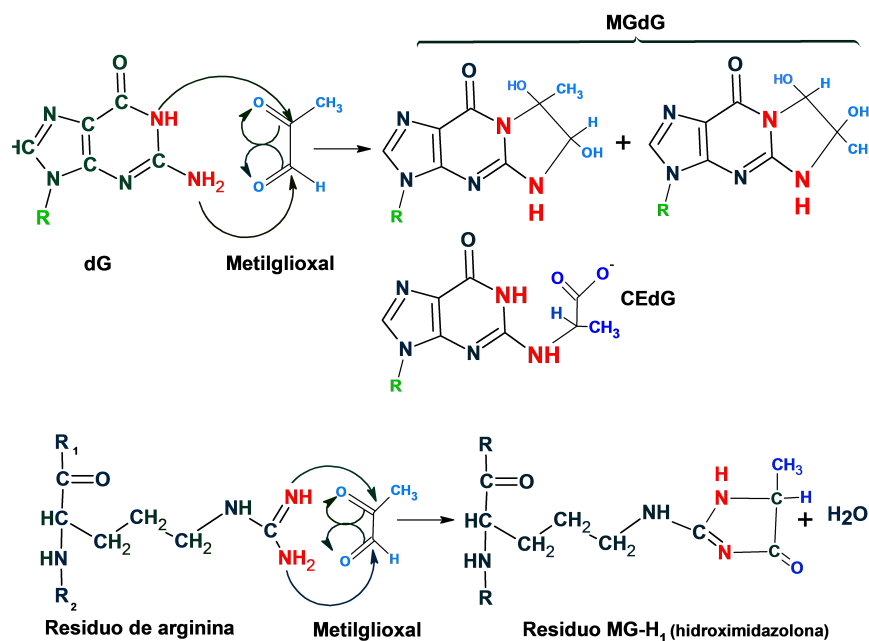


**Figura 7.** Rutas metabólicas de formación de metilglioxal. CCT complejo de rotura de la treonina; SSAO amina oxidasa sensible a la semicarbazida; NE no enzimática; MS metilglioxal sintetasa; Cit P<sub>450</sub> citocromo P<sub>450</sub>. Tomado de (6).



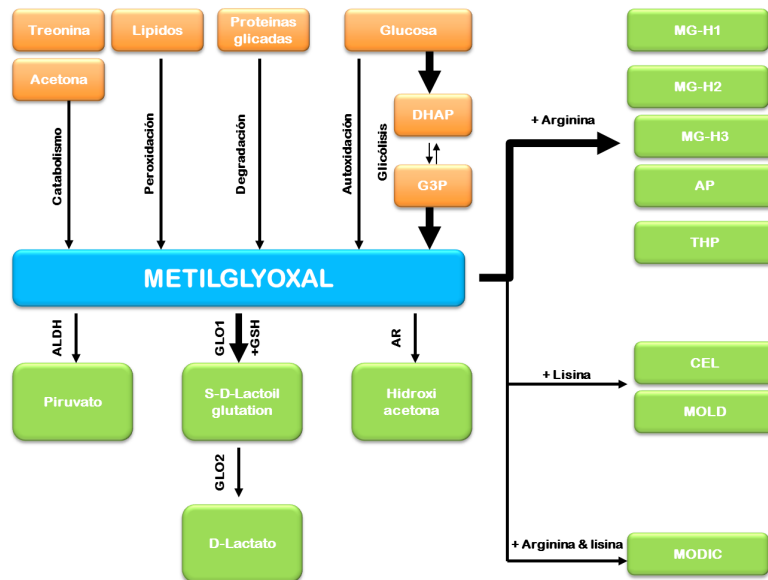


**Figura 8.** La defensa enzimática contra la glicación. (a) Metabolismo de glioxal y MG por el sistema de glioxalasa. (b) Metabolismo de 3DG por 3-desoxiglucosona reductasa, un AKRd. (c) Metabolismo de 3DG por la 3-desoxiglucosona deshidrogenasa. (d, e) Reparación de proteínas glicadas tempranas por Amadoriasa y fructosamina-3-fosfoquinasas. Tomado de 7.





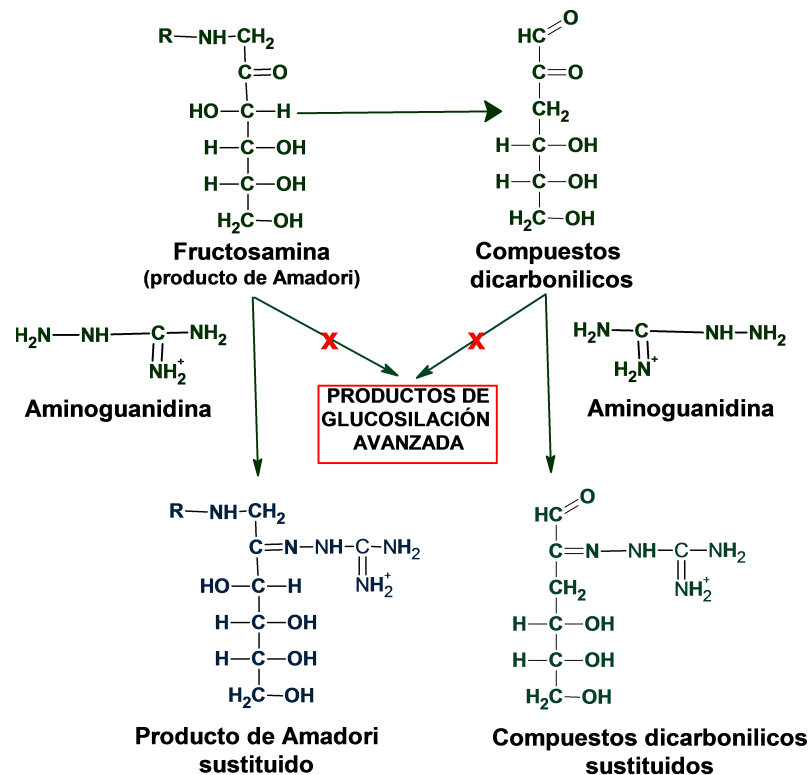
**Figura 9.** (Arriba) Formación de imidazopurinona MGdG y CedG en el ADN. El residuo de aducto se muestra solo con la base de guanina. (Abajo) Formación de hidroimidazolona MG-H1 a partir de un residuo de arginina. Tomado de (8).



**Figura 10.** Esquema/resumen del metilglioxal. El MGO se forma principalmente como un subproducto de la glucólisis y la autooxidación de glucosa. Otras fuentes de MGO son el catabolismo de treonina y acetona, peroxidación lipídica y degradación de proteínas glicadas. Los niveles aumentados de MGO son predominantemente detoxificados por el sistema de la glicoxalasa, que convierte MGO en el producto final D-lactato, a través de la formación del intermedio S-D-lactoilglutación. Además, ALDH y AR comprenden vías menores de detoxificación de MGO. Si la producción de MGO excede la capacidad de detoxificación, MGO puede modificar los residuos de arginina para formar MG-H1, -H2 y -H3, AP y THP. Cuando MGO reacciona con lisina, forma CEL y MOLDE, mientras que forma MODICO cuando forma un dímero “cross-link” con arginina y lisina. Tomado de (9).

Las evidencias más determinantes de que los AGEs están implicados en la patogénesis de las complicaciones diabéticas, proceden de resultados experimentales obtenidos con inhibidores de la formación de AGEs en modelos animales (26,27 y 28 citados por 3); y en pacientes con diabetes tipo I con nefropatía, la aminoguanidina mejoró el cuadro clínico (**figura 11**). Otros inhibidores son: carnosina, tenilsetam, OPB-9195 y piridoxamina, que atenúan el desarrollo de complicaciones diabéticas.





**Figura 11.** Prevención de la formación de productos de glucosilación avanzada mediante la aminoguanidina. La aminoguanidina se une preferentemente a los compuestos carbonílicos dando lugar a productos sustituidos que no permiten el avance de la reacción. Tomado de (10).

Los precursores de AGEs intracelulares dañan a las células por tres mecanismos:

1. Interaccionan con proteínas intracelulares (de señalización).
2. Con macromoléculas de la matriz extracelular, que interactúan de forma anómala con otros componentes y los receptores de las integrinas.
3. Las proteínas plasmáticas modificadas por los precursores, se unen a los receptores RAGE en las células endoteliales, mesangiales y los macrófagos. Que induce la producción de ROS que a su vez activa el factor de transcripción pleiotrópico NF-κB, causando cambios en la expresión génica.

*Algunos ejemplos de los efectos de los AGEs no mediados por receptor son:*

- El factor de crecimiento de fibroblastos  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en las células endoteliales (29, citado por 3).
- Las proteínas implicadas en la endocitosis macromolecular. (30 y 31 citado por 3).
- Proteínas de la matriz extracelular (ECM). El entrecruzamiento por AGEs del colágeno tipo I y la elastina provoca un aumento de grosor de la ECM, produciendo una mayor rigidez de la vasculatura (32 y 33 citado por 3).





- La glicación aumenta la síntesis de colágeno tipo III, colágeno  $\alpha 3$  (IV), colágeno tipo V, colágeno tipo VI, laminina y fibronectina en la ECM. (54–57 citado por 11).
- También interfieren con las interacciones matriz-célula. La modificación de los dominios de unión celular del colágeno tipo IV disminuye la adhesión de las células endoteliales (35 y 36 citado por 3); y la modificación en la cadena A de la molécula de laminina reduce notablemente el crecimiento de neuritas (37 citado por 3).

### *Efectos de los AGEs mediados por receptor.*

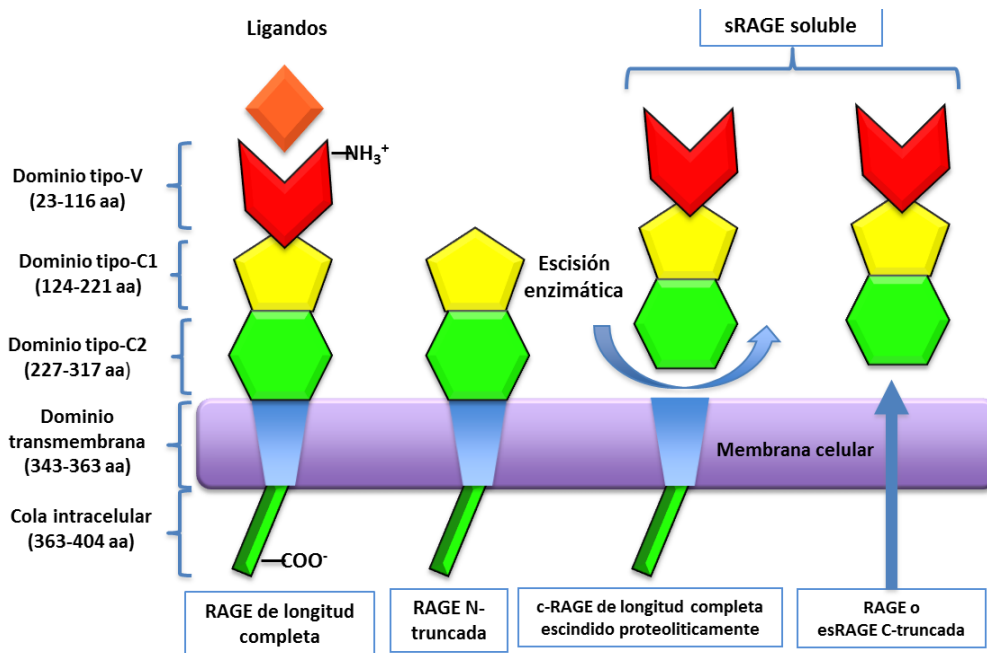
El receptor para AGEs (RAGE) es un receptor multiligando (superfamilia de las inmunoglobulinas), que se expresa de manera constitutiva en células diferenciadas; tales como cardiomiocitos, neuronas, neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos, células dendríticas y células endoteliales vasculares entre otras. Es un receptor de reconocimiento de estructuras tridimensionales. Otros ligandos para RAGE son el péptido  $\beta$ -amiloide, las proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB1o anfoterina), proteínas del grupo S100, etc. La descripción de la estructura se presenta en la **(figura 12)**.

Otros receptores, como AGE-R1 (oligosacaril transferasa-48), AGE-R2 (fosfoproteína 80K-H) y AGE-R3 (galectina-3), y el receptor carroñero “(scavenger)” de macrófagos de clase A tipos I y II, también pueden reconocer y se unen a los AGEs, pero no producen señales intracelulares. En cambio, eliminan los AGEs (endocitosis y degradación de sus ligandos) (33 y 34 citados por 11).

Receptores de clase B, CD36 y clase B I. CD36 no está involucrado en la eliminación de los AGEs de la circulación, pero juega un papel importante en la inducción de ROS en la célula. (41 y 42 citados por 11).







**Figura 12.** Representación esquemática de RAGE de longitud completa y sus variantes de empalme alternativo. RAGE se compone de una porción intracelular, un dominio transmembrana y una región extracelular que consta de tres dominios de tipo inmunoglobulina, un dominio tipo V seguido de dos dominios tipo C (C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>). El dominio de tipo V es esencial para la unión del ligando, y la eliminación del mismo da como resultado una forma N-truncada. La porción citosólica es esencial para la señalización intracelular posterior a la unión del ligando en la región V (7 citado por 12). Las formas C-truncada de RAGE solubles circulantes corresponden al dominio extracelular de RAGE que carece de los dominios intracelular y transmembrana. Las cuales pueden derivar por escisión proteolítica de RAGE de longitud completa de la superficie celular (cRAGE) o mediante empalme alternativo de ARNm de RAGE (esRAGE). C: constante; V: variable. Tomado de (13).

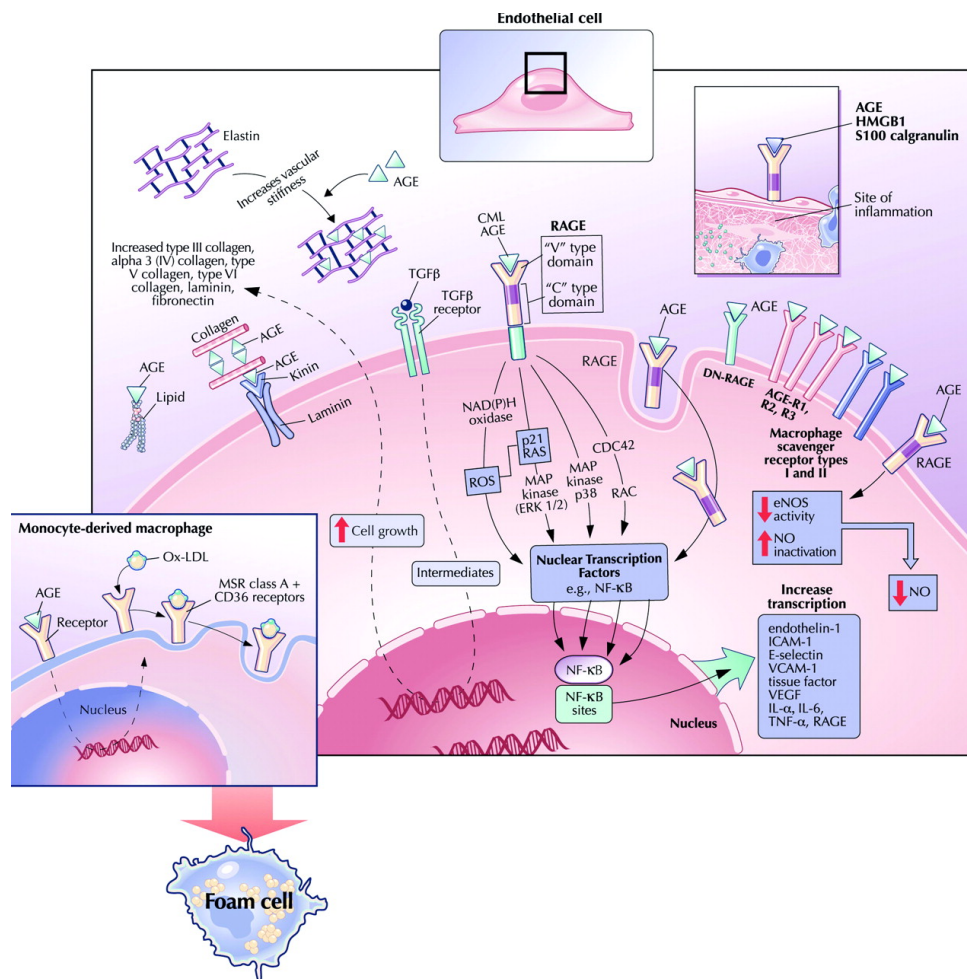
En el endotelio la estimulación de RAGE induce la activación del NF- $\kappa$ B a través de múltiples vías de transducción de señales intracelulares, incluyendo proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), quinasas reguladas por signos extracelulares 1/2 (ERK 1/2), p38, la NADPH oxidasa, la quinasa terminal Jun-N, p21 / RAS, GTPasas Cdc42 y Rac (10 citado por 12)

Cuando NF- $\kappa$ B se trasloca al núcleo celular se inicia la transcripción de diversas proteínas que favorecen el desarrollo y la progresión de las complicaciones vasculares; tales como, moléculas de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 TGF- $\beta$ 1, factor de crecimiento de tejido conectivo ((CTGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 e IL-6. Además, también activa la expresión de RAGE, “feedback” positivo (4 citado por 12). Los RAGE en otras células ejercen otros efectos: en fibroblastos la expresión de colágeno; en células musculares lisas su migración y proliferación; en fagocitos mononucleares la quimiotaxis y la haptotaxis, además de la expresión de moléculas





proinflamatorias y protrombóticas; y en los linfocitos estimula la generación de IL-2 (11 citado por 12) (figura 13).



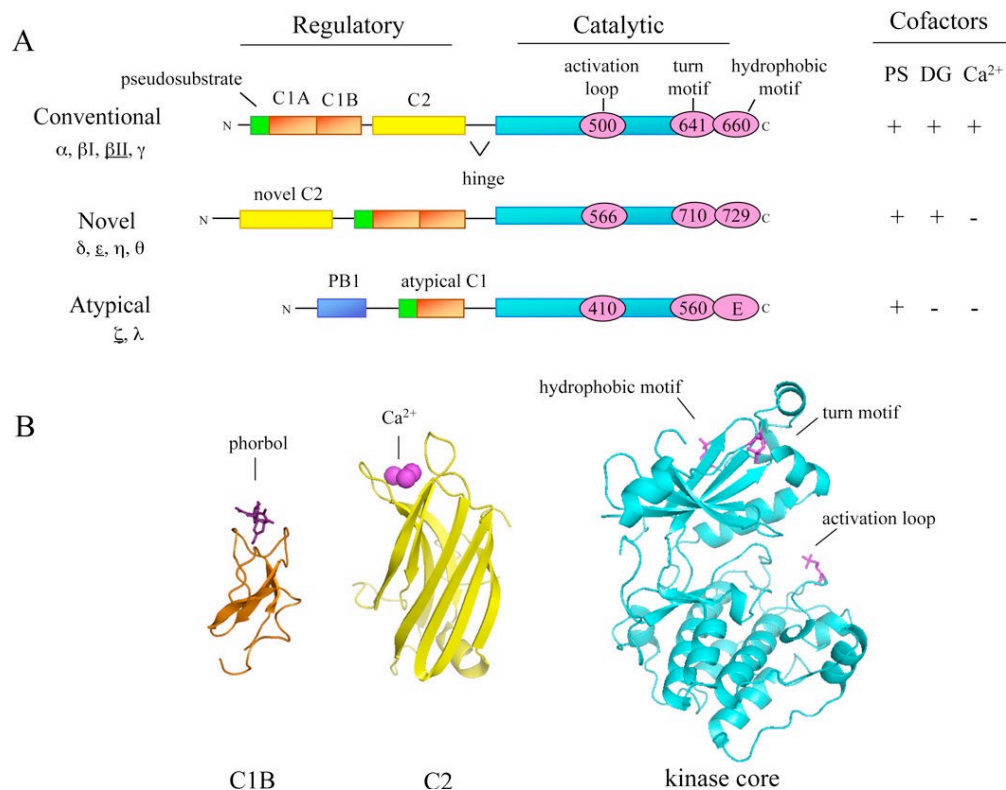
**Figura 13.** Los efectos extracelulares e intracelulares de los AGEs. En el ECM, los AGE se forman a partir de una variedad de moléculas diferentes, que incluyen lípidos, colágeno, laminina, elastina y vitronectina. La formación de AGE en las moléculas de ECM altera la constitución de la matriz y aumenta la rigidez. Los AGE también activan el receptor del factor de crecimiento transformante (TGF) - $\beta$  para estimular el crecimiento celular, lo que lleva a una mayor producción de ECM. Los AGEs que se unen a RAGE en la superficie de la célula endotelial conducen a una cascada de señalización, estimulando la NADPH oxidasa y aumentando ROS, p21 RAS y MAPK. Además, la interacción ligando-RAGE también puede estimular la señalización a través de p38 MAPK y Rac / Cdc. Una diana clave de la señalización de RAGE es NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo, donde aumenta la transcripción de varias proteínas diferentes, incluidas endotelina-1, ICAM-1, E-selectina y factor tisular. AGEs y otros ligandos para RAGE, como las calgranulinas HMGB1 y S100, desencadenan vías inflamatorias. Los AGEs pueden disminuir la disponibilidad de NO por la disminución de la actividad de NOS y por la extinción de NO. Los AGEs activan los monocitos, lo que provoca una mayor expresión de los receptores carroñeros de clase A de macrófagos (MSR) y los receptores CD36, lo que conduce a una mayor absorción de OxLDL y formación de células espumosas... ECM, membrana de la célula endotelial. Tomado de (11).





## D. Activación de la protein quinasa C.

PKC, es un miembro de la superfamilia Ser / Thr quinasas, las AGC quinasas, consta al menos de 10 isoenzimas divididas en tres subclases: convencional ( $\alpha$ ,  $\beta$ I /  $\beta$ II,  $\gamma$ ), nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) y atípica ( $\iota$  /  $\lambda$ ,  $\zeta$ ) (**figura 14**). La PKC regula muchas funciones celulares, en particular la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Nueve de ellas están reguladas por DAG (14).



**Figura 14.** Composición de dominios de los miembros de la familia PKC. **En A**, La estructura primaria de las tres clases de isoenzimas de PKC: convencional, novel y atípicas. La zona reguladora contiene los módulos de unión a cofactor: el pseudosustrato (verde); los dominios C1A y C1B (naranja) que se unen a fosfatidilserina para todas las PKC y ésteres de diacilglicerol / forbol para PKC convencionales y nuevas; el dominio C2 (amarillo) que une los lípidos aniónicos y Ca<sup>2+</sup> para las PKC convencionales; y un dominio PB1 (azul) que sirve como un módulo de interacción proteína: proteína para PKC atípicas. Los requisitos para la unión del cofactor se muestran a la derecha: PS, fosfatidilserina; DG, diacilglicerol; y Ca<sup>2+</sup>. La zona catalítica contiene el dominio conservado de quinasa (ciano) con el sitio de fosforilación del bucle de activación (círculo rosa) y una cola C-terminal que contiene dos sitios conservados de fosforilación: el motivo “giro” y el motivo “hidrofóbico” (círculos de color rosa; resaltar que para PKC atípicas un residuo de glutamato ocupa el motivo hidrofóbico). La numeración de los sitios de fosforilación es representativa de la isoenzima PKC subrayada a la izquierda. **En B**, Diagramas de cinta del dominio C1B de PKC  $\delta$  (naranja) con forbol unido (púrpura), el dominio C2 de PKC  $\beta$ II (amarillo) con Ca<sup>2+</sup> unido (rosa) y el dominio de quinasa de PKC  $\beta$ II fosforilado (azul) con fosfato en los tres sitios conservados de fosforilación: bucle de activación (rosa), motivo de “giro” (naranja) y motivo “hidrofóbico” (verde). Tomado de 14.





La hiperglucemia intracelular aumenta la concentración de diacilglicerol (DAG), por un aumento de la síntesis de novo, en células microvasculares cultivadas; y en la retina y glomérulos renales de animales diabéticos. Las isoformas  $\beta$ - y  $\delta$  de PKC son las activadas principalmente; pero también, lo hacen las isoformas  $\alpha$ - y  $\varepsilon$ - en la retina y las  $\alpha$ - y  $\beta$ - en el glomérulo (54 y 56 citados por 3) de ratas diabéticas.

Indirectamente la hiperglucemia también puede activar la PKC; tanto a través de los receptores de AGEs, como por la ruta de polialcoholes por aumento de ROS (57 y 58 citados por 3).

La activación de la PKC- $\beta$  por hiperglucemia en diferentes modelos experimentales se relaciona con:

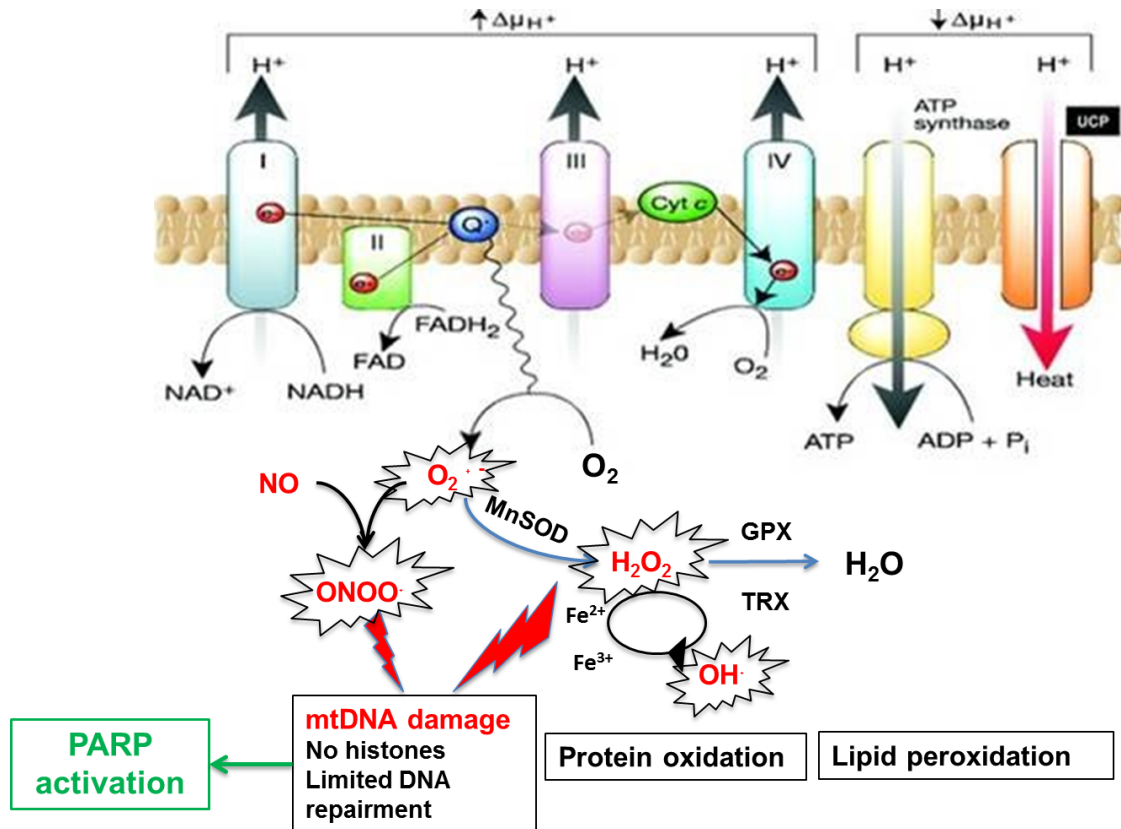
- La disminución de la producción glomerular de NO en la diabetes experimental, y con la disminución de NO en células del músculo liso; y también la expresión de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). (59, 60, 61 y 62 citados por 3).
- Aumenta la ruta endotelina-1 - MAPK en las células mesangiales glomerulares. Además, también aumenta la expresión del factor VEGF en las células del músculo liso. (63, 64 y 65 citados por 3).
- Favorece la acumulación de proteínas de la ECM microvascular al inducir la expresión de TGF-1, fibronectina y colágeno tipo IV; tanto en cultivos de células mesangiales, como en los glomérulos de ratas diabéticas. Sin embargo, el incremento de la expresión de la laminina C1 es independiente de la activación de PKC (66, 67, 68 y 69 citados por 3).
- Con la sobreexpresión del inhibidor fibrinolítico PAI-1, la activación de NF- $\kappa$ B en cultivos de células endoteliales y musculares lisas, y con la activación y regulación, de diversas oxidasas dependientes de NADPH asociadas a la membrana (70, 71 y 72 citados por 3).
- El uso de un inhibidor específico para PKC- $\beta$ , redujo la actividad de PKC en la retina y los glomérulos renales de animales diabéticos. Paralelamente también se redujo el aumento de flujo sanguíneo en la retina, se normalizó la tasa de filtración glomerular y se corrigió parcialmente la albuminuria. En la **figura 15** se presenta un esquema.







parcial del oxígeno molecular a  $O_2^{\cdot -}$  (33 citado por 6) (**figura 16**). ¡Estos datos permitieron conectar las altas concentraciones de  $O_2^{\cdot -}$  a las cuatro hipótesis!



**Figura 16.** Producción de ROS por la cadena de transporte de electrones mitocondriales. En las células endoteliales cultivadas, los donantes de electrones NADH y FADH<sub>2</sub> se generan por la oxidación del piruvato derivado de la glucosa. El flujo de los electrones donados por estos a través de la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna bombea iones H<sup>+</sup> al espacio intermembrana. Cuando el gradiente de voltaje es muy alto debido al aumento del flujo de electrones, se inhibe/enlentece el transporte de electrones en el complejo III, lo que aumenta la vida media de los radicales libres intermedios de la coenzima Q (semiubiquinona), que reduce el O<sub>2</sub> a superóxido. Los iones H<sup>+</sup> pueden pasar a través de la membrana interna a favor de su gradiente de concentración, ya sea a través de la ATP sintasa (para producir ATP) o a través de UCP, que disipan la energía del gradiente de protones en forma de calor. Cyt c indica citocromo c. Tomado de 3 y 16

En la parte inferior se muestran las complicaciones de los ROS. La enzima superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), la única enzima superóxido dismutasa ubicada en la matriz mitocondrial, para su detoxificación. Los niveles elevados de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y otros ROS que modifican/ oxidan a macromoléculas, incluidos lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (roturas de cadena lo que activa a PARP), y producen disfunción mitocondrial, activación de NF-κB y expresión alterada de genes y por último resistencia a la insulina al impedir la translocación de Glut 4. La ausencia de histonas en el ADN mitocondrial (ADNmt) y mecanismos de reparación de ADN limitados hacen que las mitocondrias sean altamente susceptibles al daño del ADN inducido por O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. GPX: glutatión peroxidasa; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno; O<sub>2</sub><sup>·-</sup>: Anión superóxido; OH·: Radical hidroxilo; TRX: Thioredoxina reductasa; PARP: poli(ADP-ribosa) polimerasa.

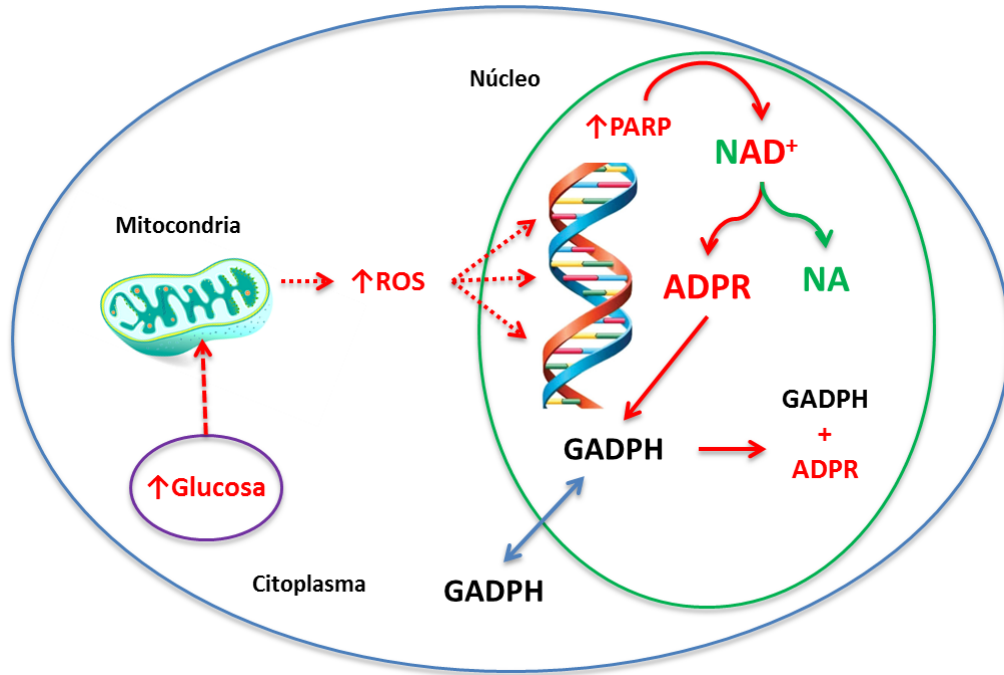




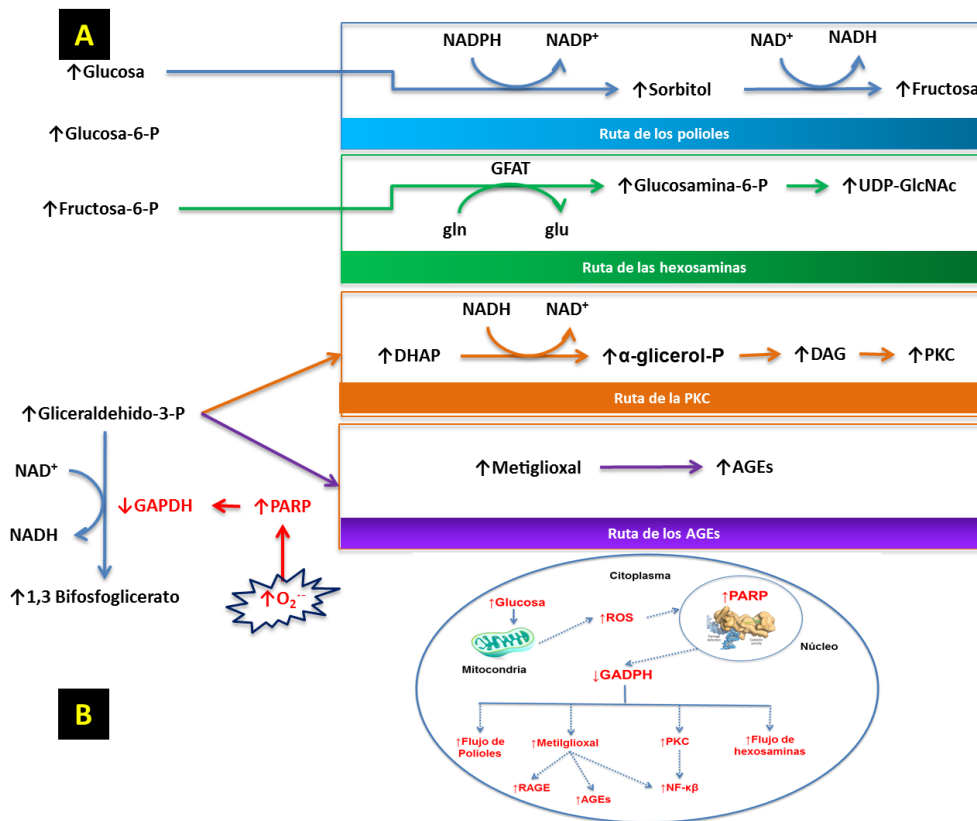
Por otro lado, Du y sus colaboradores observaron que el aumento en la producción de  $O_2^{\bullet -}$  disminuye la actividad de la G3PDH (29 citado por 6). Se conocía que esta enzima puede ser inactivada por  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet -}$  (34 citado por 6). Sin embargo; esta inactivación es reversible y persiste aun cuando las concentraciones de GSH permanecen altas. Estos resultados no encajaban bien con el modelo propuesto para hiperglucemia / estrés oxidativo / complicaciones DM.

En otros experimentos, García Soriano y colaboradores demostraron que la hiperglucemia, a través de la alta generación de (ERN) y (ROS), activan la poli (ADP) ribosa polimerasa (PARP), una enzima reparadora de ADN (35 citado por 6). La activación de PARP escinde  $NAD^+$  en ácido nicotínico y ADP-ribosa que polimeriza y es capaz de unirse a las proteínas contenidas en el núcleo regulando su actividad (36 y 37 citados por 6). Por otro lado, se observó que existe una translocación bidireccional de la enzima G3PDH citoplasma-núcleo (38 y 39 citados por 6). Brownlee en 2005 (15), propuso que la activación de PARP por la altas concentraciones de ROS; con la consiguiente poli-ADP-ribosilación de la G3PDH, sería la encrucijada entre las cuatro hipótesis (**figura 17**). En apoyo de esta hipótesis Du y sus colaboradores demostraron, que ratones knockout para PARP, cuando se sometieron a hiperglucemia, no presentaban la enzima G3PDH con polímeros de ADP-ribosa (40 citado por 6). Sin embargo, los animales controles tuvieron un aumento en la ADP-ribosilación de la enzima. Por lo tanto, en principio, está claro que la G3PDH es un punto crucial en el circuito metabólico de la diabetes. En las **figuras 18 y 19** se presenta el mecanismo molecular propuesto para las microangiopatías y macroangiopatías respectivamente (16).





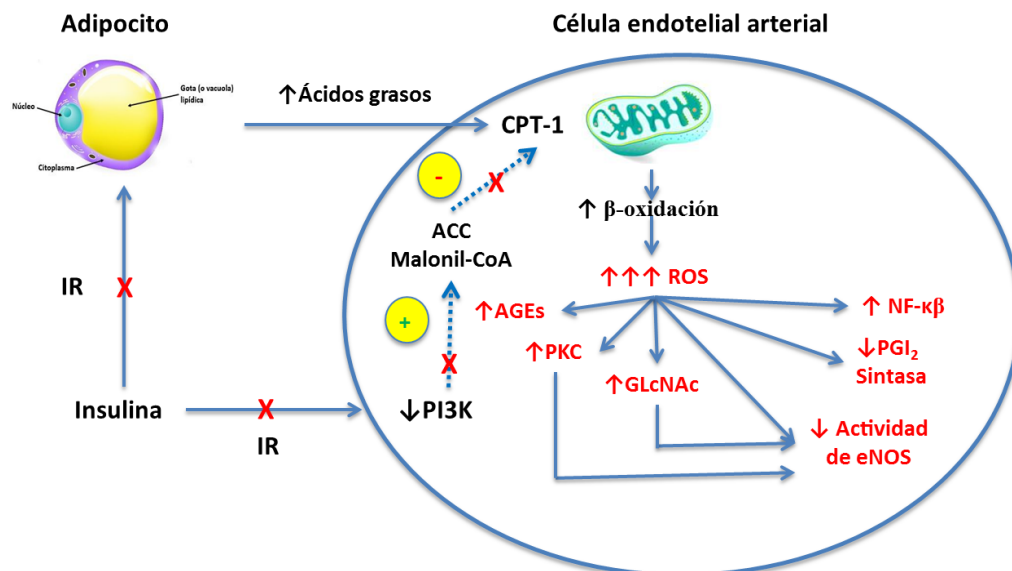
**Figura 17.** Activación de PARP e inactivación de GAPDH. El exceso de la producción de ROS en las mitocondrias como consecuencia de la hiperglucemia, produce lesiones en el DNA lo que activa a PARP; que modifica a GAPDH por ADP-ribosilación inactivándola. Tomado de (15).







**Figura 18.** La producción de superóxido mitocondrial inducido por la hiperglucemia activa las cuatro vías perjudiciales por inhibición de la GAPDH. En (A) se muestra el esquema del modelo propuesto sobre cómo se vinculan las diferentes rutas en un mecanismo unificado. El modelo está basado en la observación de que: en animales diabéticos y pacientes, e hiperglucemia en células; en todos los casos la actividad de la enzima glucolítica clave gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) está disminuida. Sin embargo, la inhibición de la actividad de GAPDH por hiperglucemia no ocurre cuando UCP-1 o MnSOD previenen la sobreproducción mitocondrial de superóxido (36 citado por 15). Cuando se inhibe la actividad de GAPDH la concentración de todos los intermediarios glicolíticos que están corriente arriba de GAPDH incrementan. Concentraciones elevadas de gliceraldehído-3-fosfato activa dos de las cuatro vías. Activa la ruta de los AGEs porque el principal precursor de AGE intracelular metilglioxal se forma a partir de este compuesto. También se activa la ruta clásica de PKC ya que su activador, diacilglicerol, también se forma a partir de gliceraldehído-3 fosfato. Más arriba en la ruta glicolítica, el incremento de fructosa-6 fosfato, aumenta el flujo a través de la vía de la hexosamina, donde la enzima GFAT convierte la fructosa-6 fosfato en UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). Finalmente, la inhibición de GAPDH aumenta los niveles intracelulares del primer metabolito glucolítico, glucosa. Esto aumenta el flujo a través de la ruta polirol donde la enzima aldosa reductasa la reduce, consumiendo NADPH en el proceso. Por último, la conexión entre el superóxido y la GAPDH es la enzima PARP. En (B) se muestra el mecanismo unificador del daño celular inducido por la hiperglucemia. Tomado de (15) y (16).



**Figure 19.** Mecanismo esquemático por el cual el IR provoca un aumento de la oxidación de FFA en las células endoteliales arteriales, activando señales proaterogénicas e inhibiendo enzimas antiaterogénicas. Resultados experimentales indican que el IR en sí misma promueve la aterogénesis en ausencia de hiperglucemia. La IR en los adipocitos aumenta la liberación de ácidos grasos libres a partir de los triglicéridos almacenados, y el aumento de la oxidación de los FFA en las células endoteliales aórticas debido a la falta de estimulación por la insulina de la producción de malonil CoA provoca una mayor producción de superóxido por la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Al activar los mismos mecanismos que los ROS inducidas por hiperglucemia; la sobreproducción de superóxido inducida por FFA activa una variedad de señales proinflamatorias e inactiva dos enzimas antiaterogénicas importantes: prostaciclina sintasa y eNOS. IR, resistencia a la insulina; ACC, acetil-CoA carboxilasa; CPT-I, carnitine palmitoiltransferase I; AGE, productos de glicación avanzada; GlcNAc, N-acetilglucosamine; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina. Tomado de (16).





## 5.- Conclusiones

---

1. La hiperglucemia es el principal factor de riesgo en la DM, originando complicaciones crónicas en ciertos órganos como el ojo, el riñón o vasos sanguíneos.
2. Ruta de los polioles: se produce una acumulación de la fructosa y del sorbitol, además de una disminución de la concentración de NADPH, provocando diversas alteraciones metabólicas, como la alteración de la homeostasis o deficiencia en los sistemas antioxidantes.
3. Ruta de biosíntesis de las hexosaminas: la activación de esta ruta parece estar relacionada con el síndrome de resistencia a insulina/síndrome metabólico. Se ha visto una correlación entre el incremento de UDP-N-acetilglucosamina y de la actividad de la GFAT; y la baja captación de glucosa en los tejidos adiposo y muscular.
4. La glicosilación no enzimática: la formación intracelular de precursores de AGEs son importantes en la patogénesis de la diabetes. Estudios recientes han demostrado que el uso de inhibidores de los AGEs, atenúan el desarrollo de complicaciones diabéticas.
5. La activación de la protein kinasa C: provoca consecuencias patológicas al afectar la expresión de eNOS, ET-1, VEGF, TGF- $\beta$  e (PAI-1), y por la activación de NF-kB y NAD (P) H oxidadas.
6. Estrés oxidativo: cada uno de los cuatro mecanismos patogénicos diferentes descritos tienen un denominador común inducido por la hiperglucemia, la sobreproducción de superóxido por la cadena de transporte de electrones mitocondriales.
7. La producción de  $O_2\bullet^-$  causa una disminución en la actividad de la G3PDH por poliADP-ribosilación, punto crucial en el circuito metabólico de la diabetes, el cual puede ser un factor clave en el futuro para el diseño de nuevos medicamentos y terapias contra la diabetes.





## 6.- Referencias Bibliográficas

1. Díaz Flores M, Baiza-Gutman LA, Ibáñez-Hernández MA, Pascoe-Lira D, Guzmán-Greenfel AM, Kutmate-Rodríguez J. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Médica de México*. 2004; Vol 140 No.4. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0016-38132004000400014](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132004000400014)
2. Akella N, Ciraku L, Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cáncer. *BMC Biology*. 2019 July; 17:52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31272438/>
3. Brownlee M. Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications. *Nature*. 2001 Dec; 414(6865):813-20. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11742414/>
4. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas H. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*. 1999; 344, 109-116. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220620/>
5. Olmos PR, Niklitschek S, Olmos R, Faúndez J, Quezada T, Bozinovic M, et al. Bases fisiopatológicas para una clasificación de la neuropatía diabética. *Rev Med Chile*. 2012; 140: 1593-1605. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v140n12/art12.pdf>
6. Sartori A, Henriques Bechara E. Metilglioxal: uma toxina endógena. *Química Nova*. 2010; Vol. 33, No 10: 2193-2201. Disponible en: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010001000032&script=sci\\_abstract&tlng=es](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010001000032&script=sci_abstract&tlng=es)
7. Rabbani N, Thornalley P. Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2008 Oct. 36(5):1045-1050. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2639773/>
8. Rabbani N, Xue M, Thornalley P. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconj J*. 2016 Jul; 33:513–525. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27406712/>
9. Maessen D, Stehouwer C, Schalkwijk C. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clinical Science*. 2015 Jun; 128(12):839-61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25818485/>
10. González Flecha FL, Castello P, Gagliardino J, Rossi JP. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al día internacional*. 2000 Junio; Vol 3, N°2. Disponible en: <https://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero2/articulos/v3n2a2v1.PDF>





11. Goldin A, Beckman J, Schmidt AM, Creager M. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*. 2006 Aug; 114(6):597-605. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16894049/>
  
12. Díaz-Casasola L, Luna-Pichardo D. Productos finales de glicación avanzada en la enfermedad cardiovascular como complicación de la diabetes. *Revista de Medicina e Investigación*. 2016;Vol. 4. N°1. Disponible en: <http://www.rmi.diauaemex.com/pdf/2016/enero/12-Espacio%20Académico%20Estudiantil.pdf>
  
13. Kuang Chuah Y, Basir R, Talib H, Tie T, Nordin N. Receptor for Advanced Glycation End Products and Its Involvement in Inflammatory Diseases. Hindawi Publishing Corporation, *International Journal of Inflammation*. 2013; Vol 2013. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/iji/2013/403460/>
  
14. Gould CM, Newton AC. The Life and Death of Protein Kinase C. *Curr Drug Targets*. 2008 Aug; 9(8):614-625. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5783564/>
  
15. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun; 54(6):1615-25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15919781/>
  
16. Giacco F, Brownlee M, Schmidt AM. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*. 2010 Oct; 107:1058–1070. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21030723/>

