

## Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en pacientes diabéticos tratados con pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa

Prof. Alcázar Montenegro, H

Dr. Alcázar Leyva, S.

Dr. Gámez Murrieta, A.

M. en C. Benítez Rodríguez, M.T.

Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye

Facultad de Ciencias, UNAM

*Trabajos realizados con anterioridad tanto a nivel clínico como experimental en el Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, permiten proponer que la cocarboxilasa o pirofosfato de tiamina (PPT) estable en solución, al aplicarse a pacientes con hiperglucemia, mejora la incorporación de la glucosa a los tejidos. Con base en tales hechos, un posterior estudio pretende analizar si el PPT ejerce acción alguna sobre el ciclo de las pentosas. Para demostrar esto, se estudió la conducta de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) en los eritrocitos humanos, toda vez que su actividad se ha encontrado disminuida en los pacientes afectados por diabetes mellitus. Para comprobarlo se seleccionaron 10 pacientes de uno u otro sexo, de 45 a 70 años de edad y con diagnóstico de diabetes tipo II. De cada uno se tomó una muestra sanguínea antes de iniciar el tratamiento con PPT y posteriormente a los 15, 30, 60, 90 y 120 días después de obtener la primera muestra, a fin de determinar la actividad de G-6-PD, así como las de glucosa, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos y hemoglobina glucosilada. Los resultados obtenidos demuestran que la glucemia tiende a registrar niveles normales, alcanzando una recuperación física plena en 70% de los pacientes; en 100% de ellos, también se normalizaron los niveles de colesterol y de triglicéridos. La hemoglobina glucosilada disminuye considerablemente en relación con los valores registrados antes de iniciar el tratamiento. Con respecto a la actividad de la G-6-PD, los autores observaron que ésta se incrementa, en promedio, de 3 a 5 U/g de hemoglobina en los pacientes hiperglucémicos; el máximo incremento de actividad se registra entre el segundo y tercer mes de tratamiento, lo cual indica que PPT participa en: 1) la incorporación de glucosa al interior de los eritrocitos, toda vez que dicha sustancia disminuye la glucosa sérica; 2) la utilización de la glucosa en el metabolismo de los*

## Introducción

La diabetes mellitus se caracteriza por una serie de manifestaciones patológicas producto de múltiples alteraciones a nivel bioquímico, celular, tisular y sistémico. Dentro de las primeras, está la que Marks informa en 1964<sup>1</sup> relacionada con la deficiencia en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD: D-G-6-P, oxidoreductasa, EC 1.1.1.49). Esta enzima participa en el metabolismo de los carbohidratos al catalizar el primer paso en la vía de las pentosas oxidando la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato y reduciendo el NADP a NADPH. Marks acepta que existe una considerable heterogeneidad en cuanto a la severidad de la deficiencia de la actividad enzimática, los tejidos involucrados, las características de la enzima y la susceptibilidad de los sujetos afectados a la deficiencia de la actividad enzimática. También se ha informado que en los pacientes diabéticos la oxidación de la glucosa está disminuida,<sup>2</sup> por lo que se ha determinado que este padecimiento es un desorden de tipo metabólico, de ahí que se considere el uso de sustancias que regulen el metabolismo como método terapéutico en la diabetes.<sup>3</sup>

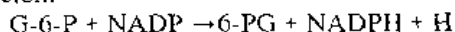
En trabajos previos se ha mostrado experimental y clínicamente<sup>4,5</sup> que el pirofosfato de tiamina (PPT) o cocarboxilasa estable en solución, participa en la regulación de la glucemia, colesterol, triglicéridos y disminuye la proporción de hemoglobina glucosilada cuando se administra a pacientes diabéticos, por lo que se considera que regula el metabolismo ya que la sintomatología característica del padecimiento desaparece.

En el presente trabajo se trata de demostrar que el PPT participa eficazmente en la regulación del metabolismo celular al evaluar la actividad de la G-6-PD en eritrocitos de sujetos normoglucémicos y pacientes afectados de diabetes mellitus no-insulinodependientes, antes, durante y al término del tratamiento a base de PPT.

## Material y método

Se seleccionaron dos sujetos normoglucémicos y 10 pacientes afectados de diabetes mellitus no insulinodependientes (tipo II), mayores de 45 y menores de 70 años de edad, de ambos sexos, que se sometieron a tratamiento a base de PPT o cocarboxilasa estable en solución, a una dosis de 120 mg con el siguiente esquema de frecuencia: diario durante 15 días; cada tercer día durante un mes; dos veces por semana durante el mes siguiente; una vez por semana por un mes, a completar cuatro meses de tratamiento. Se les tomó una muestra de sangre periférica (5 ml) antes de iniciar el tratamiento con PPT y posteriormente a los 15, 30, 60, 90 y 120 días después de iniciado éste.

La determinación de la G-6-PD se hizo por el método Sigma, que es una modificación del método espectrofotométrico de Kornberg y Horrecker<sup>6</sup> y de Lohr y Waller,<sup>7</sup> que implica la reacción:



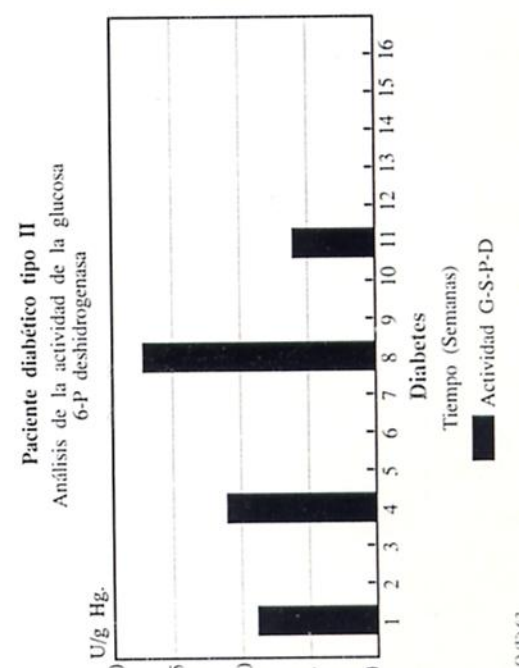
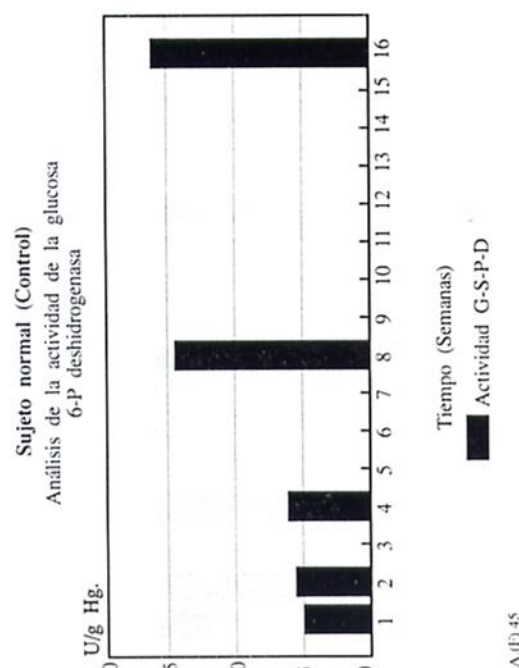
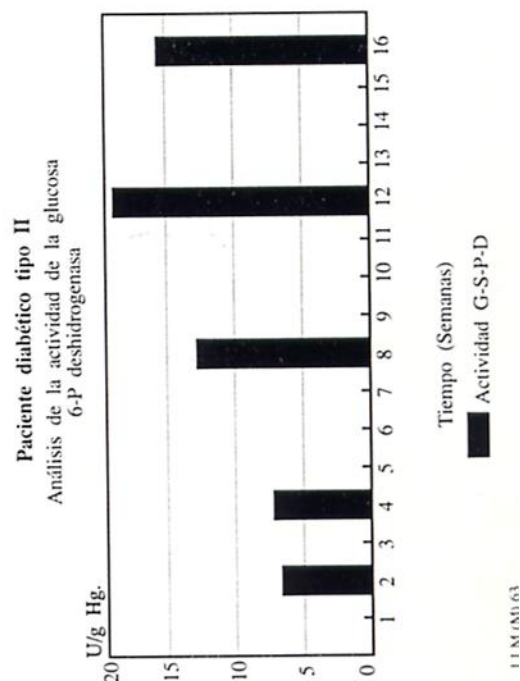
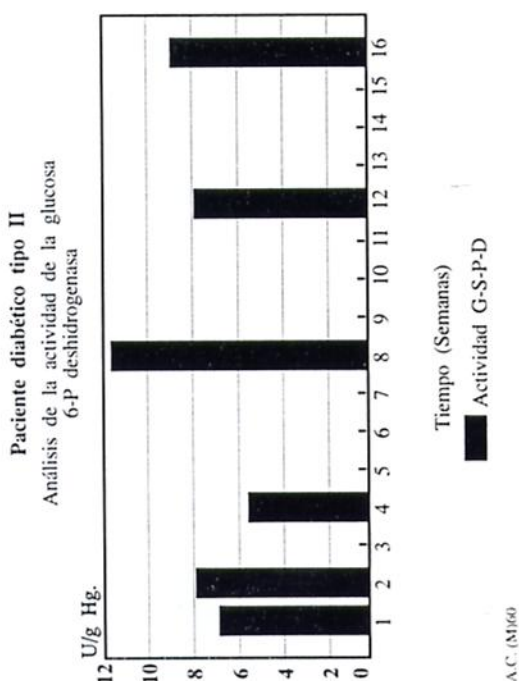
en presencia de la G-6-PD. El grado de formación del dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducida (NADPH) es proporcional a la actividad de la enzima y se mide espectrofotométricamente como un incremento en la absorbancia a 340 nm.

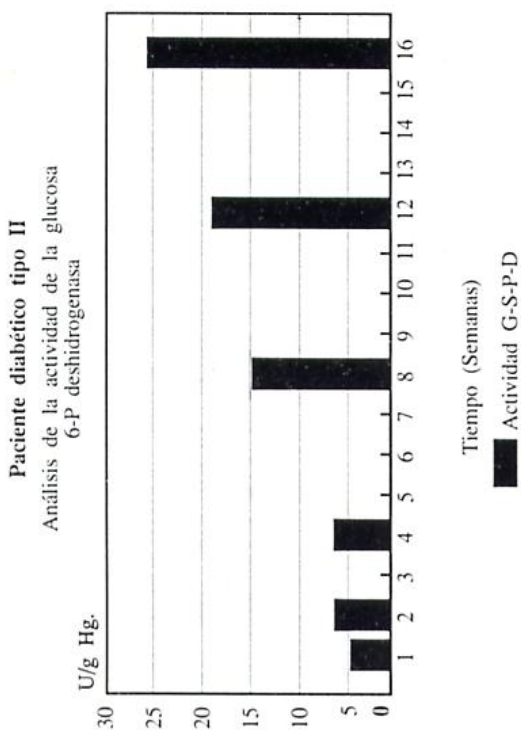
De la sangre se toman 0.5 ml y se mezclan con anticoagulante a base de ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa (ACD),<sup>8</sup> con la que se hacen las determinaciones de la G-6-PD de acuerdo a la técnica mencionada. El resto de la muestra sanguínea se centrifuga para la obtención del suero, con el que se hacen los análisis de colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos siguiendo las técnicas apropiadas.<sup>9-12</sup> Previamente se toma la sangre necesaria para las determinaciones de glucosa y hemoglobina glucosilada (HAI), por las técnicas correspondientes.<sup>13,14</sup>

## Resultados

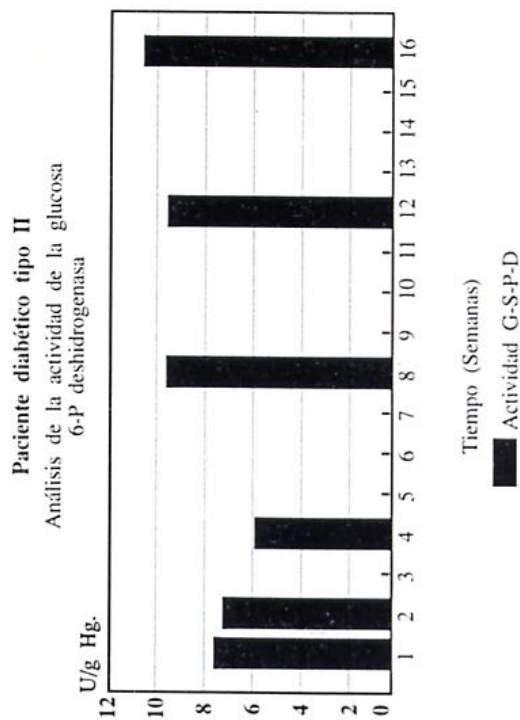
Las figuras muestran los valores de la actividad de la G-6-PD en los diferentes tiempos, antes, durante y al término del tratamiento. El rango normal de la actividad de la enzima es de 4.6 a 13.5 U/g Hb. Se considera como unidad internacional la actividad de la G-6-PD necesaria

A este trabajo se le otorgó el Primer Lugar en el Área de Química Clínica de los trabajos libres presentados en el XV Congreso Nacional de Química Clínica que tuvo lugar del 3 al 5 de mayo de 1992 en la ciudad de Querétaro, Qro.

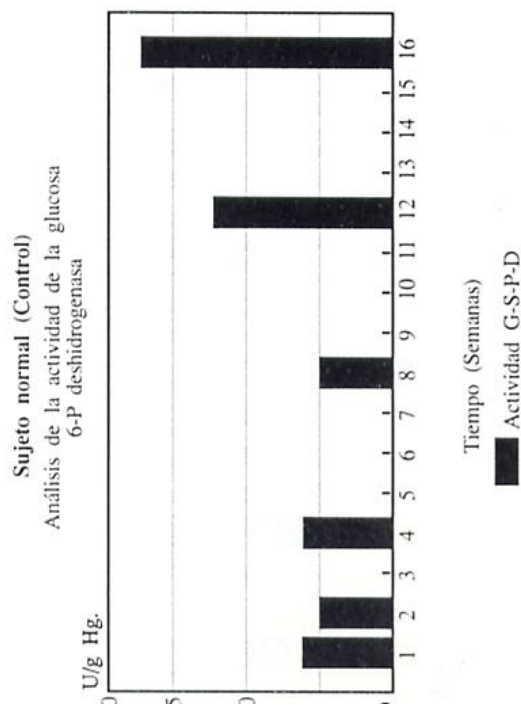




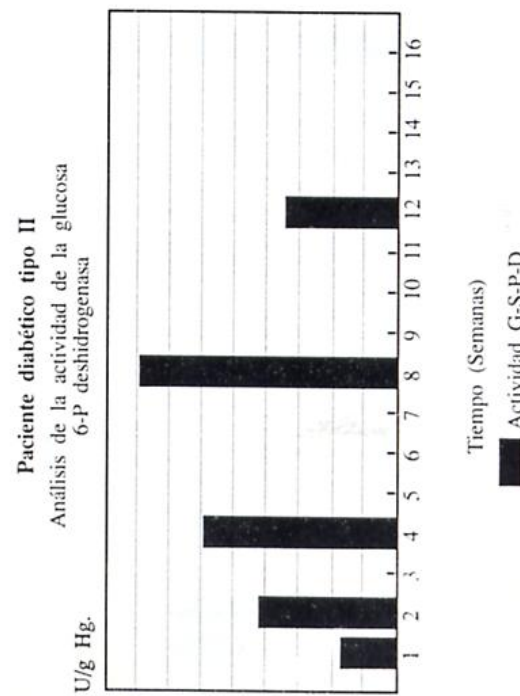
F.C.(1)72



C.H.(1) 53



F.B.R.(1)45



L.(1) 48

para convertir un micromol de sustrato/minuto/gramo de hemoglobina.

Como se puede observar, en los sujetos normoglucémicos la actividad de la enzima también sufre modificaciones dentro de los valores normales, en tanto que en los pacientes afectados de diabetes mellitus, tipo II, la actividad se modifica en diversas magnitudes, pero todas ellas estadísticamente significativas. Como se puede observar, dos de los pacientes ingresan con valores por debajo del rango normal y recuperan la actividad normal durante el tratamiento, mientras que la mayoría de los pacientes ingresan con valores que caen dentro del rango normal, pero la actividad enzimática se incrementa durante el tratamiento y la diferencia es muy significativa si consideramos el valor de la actividad enzimática que presentaron antes de iniciar el tratamiento. Los resultados también mostraron que la glucemia se regula en un 70% de los pacientes, de manera concomitante a como se activa la enzima. También se normalizan los valores de colesterol total, HDL, LDL (70% de los pacientes), triglicéridos (100% de los pacientes) y disminuye la HbA1c.

## Discusión

La actividad de la G-6-PD depende específicamente de la presencia del sustrato<sup>15</sup> (la glucosa-6-fosfato) que se encuentra en el interior de los eritrocitos. En los pacientes diabéticos, la principal característica es la hiperglucemia como consecuencia de alteraciones que impiden la incorporación de la glucosa a las células del organismo,<sup>16</sup> lo que a su vez induce otros procesos patológicos,<sup>17-20</sup> por lo que se ha investigado exhaustivamente en la búsqueda de mecanismos que controlen la hiperglucemia. Con la administración de PPT en estos pacientes se ha observado que se regula la glucemia en un 70% de ellos, lo que ha permitido proponer que el PPT favorece la incorporación de la glucosa al interior de las células.<sup>21</sup>

En el presente trabajo es interesante el resultado del incremento de la actividad de la G-6-PD en el 100% de los pacientes así como en los sujetos controles, ya que permite considerar que el papel del PPT no sólo es regular la glucemia, sino además permitir la incorporación de la glucosa a los eritrocitos; también favorece la oxi-

dación de la misma por la vía de las pentosas, lo que demuestra que la glucosa se está utilizando en las vías metabólicas, regulando así el déficit metabólico de los pacientes diabéticos. El uso terapéutico del PPT o cocarboxilasa estable en solución es apropiado, ya que permite la recuperación de las alteraciones bioquímicas que se encuentran deprimidas en los diabéticos: la actividad de la G-6-PD y la oxidación de la glucosa por la vía metabólica de las pentosas.

## Conclusiones

El efecto que produce el pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa estable en solución al aplicarse en pacientes afectados de diabetes mellitus no insulino dependientes, es regular el metabolismo energético que se encuentra deprimido en ellos, ya que se regula la glucemia (70% de los pacientes), el colesterol, HDL, LDL (70% de los pacientes), triglicéridos (100% de los pacientes) y fundamentalmente porque se incrementa la actividad de la G-6-PD (100% de los pacientes), con lo que mejora la oxidación de la glucosa a través de la vía metabólica correspondiente y aporte energético.

## Referencias

1. Marks P.A: The red blood cell. C. Bishop, D. M. Surgeon Eds. pp 211 *Acad. Press*. Nueva York, N.Y. (1964)
2. Butler P.C, Kryshak E.J, Marsh M, Rizza R.A: Effect of insulin on oxidation of intracellularly and extracellularly derived glucose in patients with NIDDM. Evidence for primary defect in glucose transport and/or phosphorylation but not oxidation. *Diabetes* 39:1373 (1990).
3. Borgna PC, Maccardi P, Pinelli L: Thiamine responsive anemia in DIDMOA D syndrome. *J Pediatr* 114:405 (1989).
4. Alcázar L, Bonilla M, Benítez M.T: Remisión de diabetes en ratas tratadas con pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa estable en solución. XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Colima, Col. (1991).
5. Alcázar M.H, Alcázar S, Rivera R.M, Moreno J: Pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa) estable en solución como tratamiento de la diabetes. *Inv Med Intern* 16:83 (1989).
6. Kornberg A, Horecker B.L: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. En: *Methods in Enzymology*. S.P. Colowick, N.O. Kaplan Eds. Vol. 1 *Acad Press* Nueva York, N.Y. 323 p.p. (1955)
7. Lohr G.W, Waller H.D: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. En: *Methods of enzymatic analysis*. H.V. Berg.

- meyer Ed. Acad Press Nueva York, N.Y. 636 p.p. (1974).
8. WHO Technical reports series No. 366. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. (1967).
  9. RIM Henry. Clinical Chemistry. 2nd. Ed. Harper, R., S. Row Pub. Nueva York, N. Y. 1440-1443. (1974).
  10. Assmann G: High density lipoproteins. *Internist* 20:559 (1979).
  11. Wieland H, Seidel D: Low density lipoproteins determinations. *J Lipid Res* 24:904 (1983).
  12. Witter RF, Whitner VS: Determination of serum triglycerides. Blood lipids and lipoproteins. Quantitation, Composition and Metabolism. 76 (1972)
  13. Bergmeyer HV: Methoden der enzymatischen analyse. Vol. 1. 3 Ed. Verlag Chemie, Weinheim. 175 (1974).
  14. Schnek AG, Schroeder WA: Glycosylated hemoglobin HbA1. Test combination. *J Amer Chem Soc* 83:1472-1478 (1961)
  15. Guma HA, Novello F, McLean P: The pentose phosphate pathway of glucose metabolism. *Biochem J* 114:253 (1969).
  16. Sowers JR: Diabetes and hypertension. *Am J Med* 87:6A (1989).
  17. Rendell M, Bergman T, O'Donnell G, Drobny E, Borgos J, Bonner RF: Microvascular blood flow, volume, and velocity measured by laser Doppler techniques in IDDM. *Diabetes* 38:819 (1989).
  18. Ishi H, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H: Changes in the phosphoinositide turnover,  $Ca^{++}$  mobilization and protein phosphorylation in platelets from NIDDM patients. *Diabetes* 39:1561 (1990)
  19. Greene DA, Lattimer SA, Sima AAF: Sorbitol, phosphoinositides, and  $Na^{+}/K^{+}$  ATPase regulation are involved in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes* 37:688 (1988).
  20. Kalter-Leibovici O, Van Dick DL, Leibovici L, Loya N: Risk factors for development of diabetic nephropathy and retinopathy in Jewish IDDM patients. *Diabetes* 40:204 (1991).
  21. Guzmán TE: Pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa como regulador de la incorporación de carbohidratos a los tejidos. Tesis profesional, Facultad de ciencias, UNAM. 1992.

### Summary

Previous works performed at clinical and experimental level at the Hans Selye Scientific Research Institute, have allowed us to propose that Cocarboxylase or Thiamine Pyrophosphate (TPP) stable in solution, when applied to hyperglycemic patients, improves input of glucose into the tissues. On such basis, a subsequent study aims to analyze if TPP acts on the pentose cycle; in order to demonstrate so, we proposed to study the behavior of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) in human erythrocytes, since its activity has been reported as diminished in patients affected by Diabetes Mellitus. To work on that, 10 patients of either sex aged 45-70 and suffering from Diabetes type II, were selected. A blood sample was taken from each one of them before starting treatment based on TPP and then at 15, 30, 60, 90 and 120 days after obtaining the first sample, in order to determine the activity of G-6-PD, as well as that of glucose, total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, total hemoglobin and glycosylated hemoglobin. Results showed that: glycemia tends to reach normal levels, reaching total physical recovery in 70% of patients; in 100% of them, the cholesterol and triglycerides levels were also normalized. The glycosylated hemoglobin decreases considerably as compared to values shown before starting treatment. In relation to the G-6-PD activity, we found that it increases, in average, from 3 to 5 U/gr of hemoglobin in hyperglycemic patients; maximum increase of activity is found between the second and third month of treatment, a fact which indicates that TPP participates in: 1) the incorporation of glucose into the erythrocytes, given that it decreases the seric glucose; 2) the utilization of glucose in the metabolism of these cell, and 3) the pentose cycle, given that the activity of G-6-PD increases significantly.